

**Corso di**  
**Proprietà di**  
**Biopolimeri**

***Prof. R. URBANI***

**LM Chimica**  
**Dipartimento di Scienze Chimiche**  
**e Farmaceutiche**  
**a.a. 2021-2022**



**SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO**

# Interazione tra luce e materia

**Cosa succede quando una radiazione elettromagnetica interagisce con la materia?**

◆ **parte della radiazione può essere assorbita**

◆ **Può variare la velocità della radiazione**

**(tutti i materiali hanno un indice di rifrazione!!!)**

$$n = \frac{c}{v}$$

$$v = \frac{c}{\sqrt{1 + \chi}}$$

Il fattore  $\sqrt{1 + \chi}$  è l'indice di rifrazione  
 $\chi$  suscettività elettrica

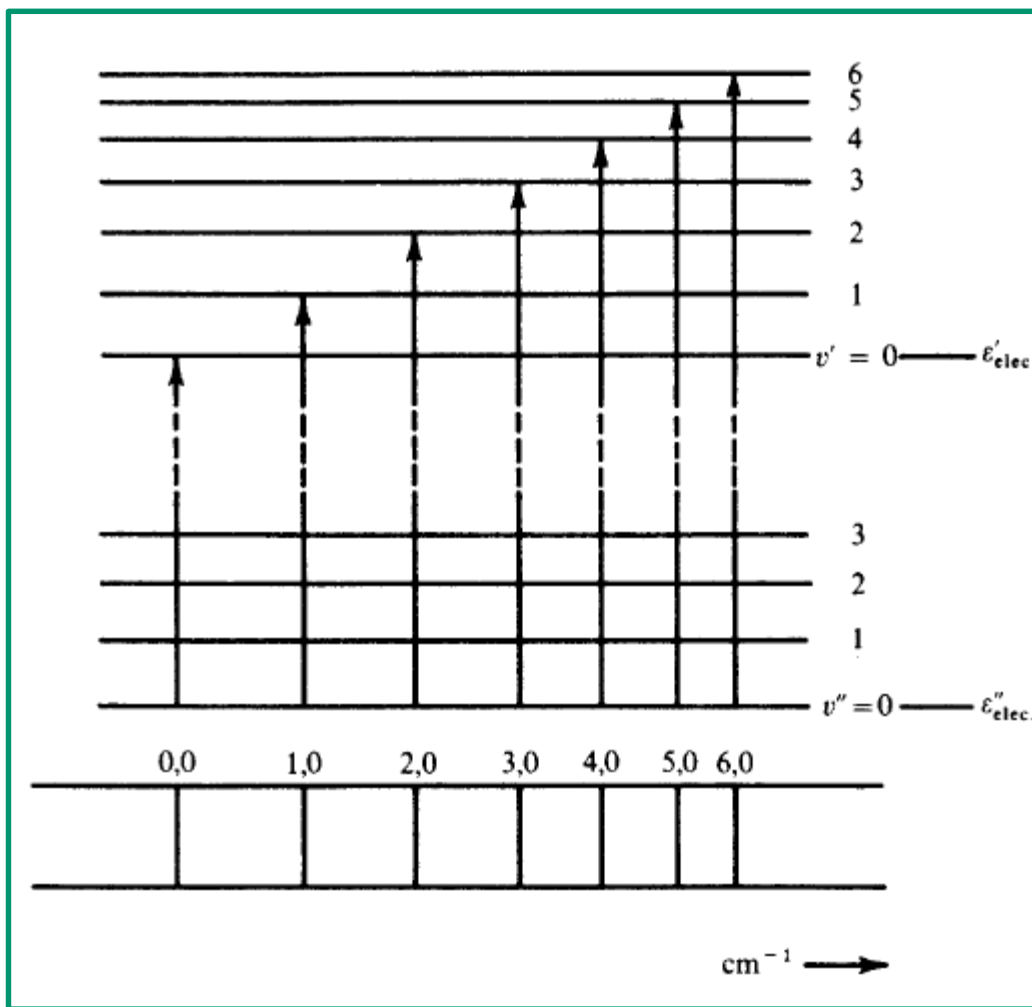


La regione spettrale di interesse per la spettroscopia UV-Vis copre l'intervallo

$$3 \times 10^{14} \text{ Hz} - 3 \times 10^{16} \text{ Hz}$$
$$1000 \text{ nm} - 10 \text{ nm}$$

che corrisponde a valori di energia in grado di provocare transizioni elettroniche.

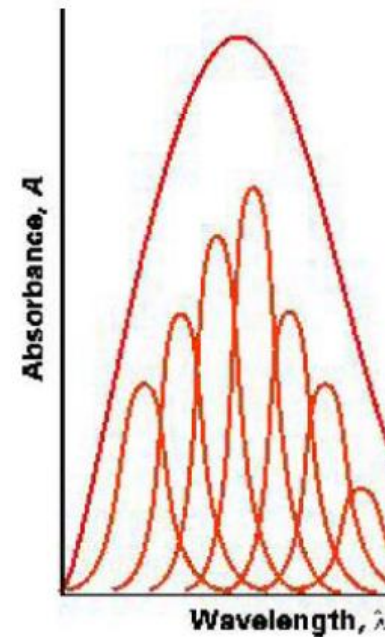
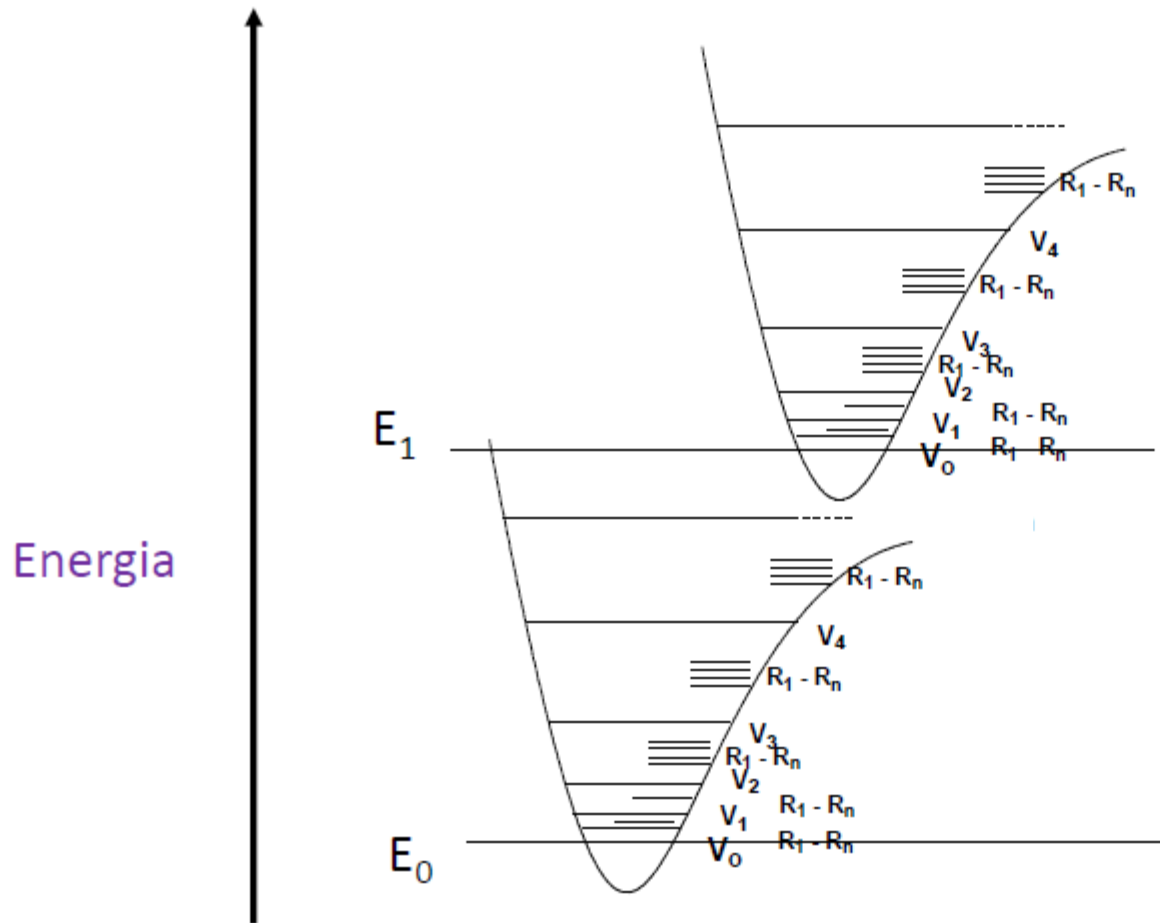
Questo tipo di spettroscopia trova applicazioni sia in assorbimento che in emissione.



Normalmente, le molecole hanno molti stati eccitati elettronici, così l'intero spettro di assorbimento, anche di una molecola biatomica, è più complicato di quello in figura.

Gli spettri di emissione molecolari sono di norma estremamente più complicati.

# Bande Spettri UV-Vis

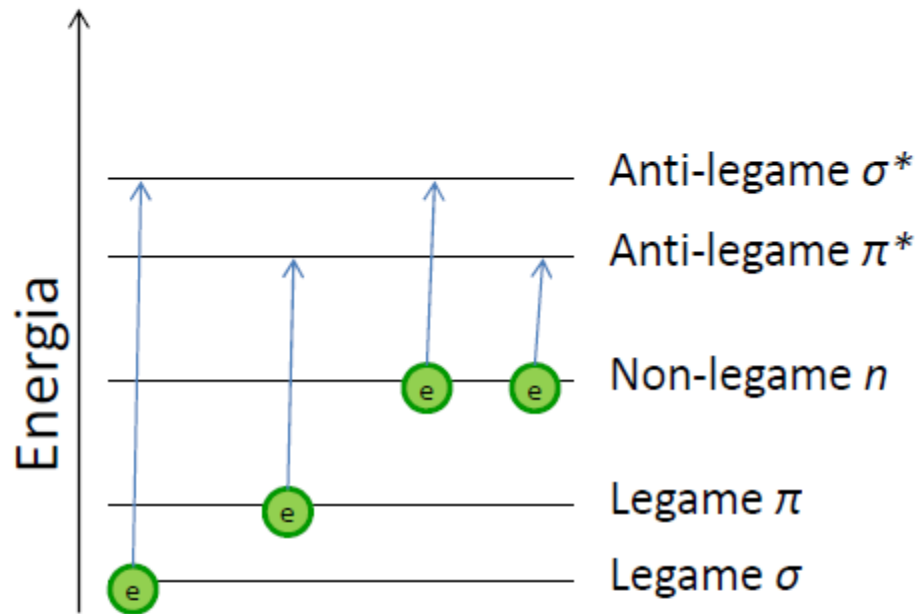


A differenza di altre spettroscopie (IR, NMR) dove è possibile osservare picchi risolti, nell'UV-Vis la sovrapposizione dei livelli energetici dà luogo a bande sovrapposte.

# Tipi di transizioni elettroniche

- L'assorbimento di radiazioni ultraviolette o visibili è in genere (ma non solo) dovuto all'eccitazione di elettroni di legame ( $\sigma$ ,  $\pi$ ) o non legame ( $n$ ).
- La frequenza delle bande di assorbimento può essere correlata ai tipi di legame presenti nelle molecole considerate:
  - identificazione gruppi funzionali
  - Determinazione quantitativa di composti contenenti gruppi assorbenti

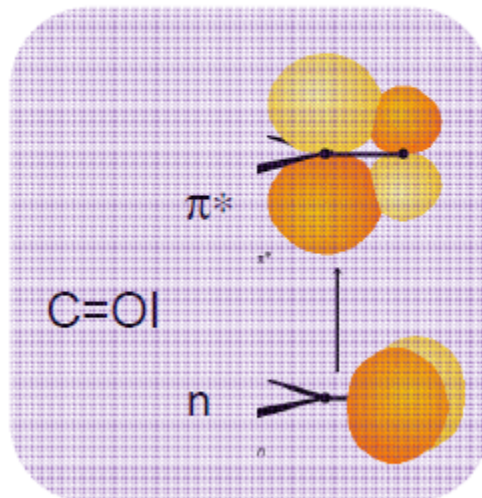
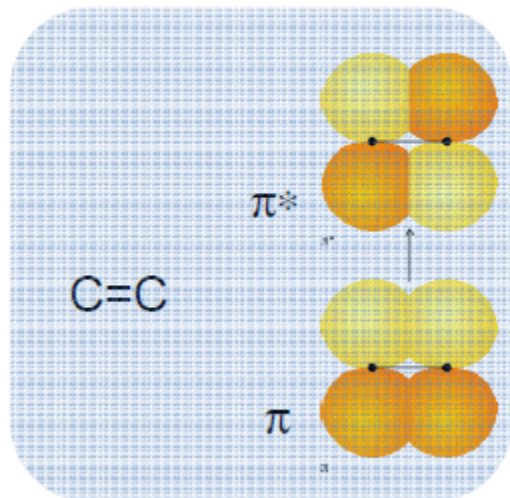
# Transizioni elettroniche ( $\pi$ , $\sigma$ o $n$ )



- $\sigma \rightarrow \sigma^*$  : transizioni altamente energetiche (range tipico  $\sim 125\text{nm}$ )  
Es. legame C-H degli alcani

- $n \rightarrow \sigma^*$  : meno energetiche delle precedenti ( $150\text{-}250\text{ nm}$ ) Es. composti saturi contenenti doppietti solitari (C, N, S, alogeni)

- $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  : la maggior parte dei composti studiati tramite UV-Vis ricade in questo tipo di transizioni. ( $200\text{-}700\text{ nm}$ )

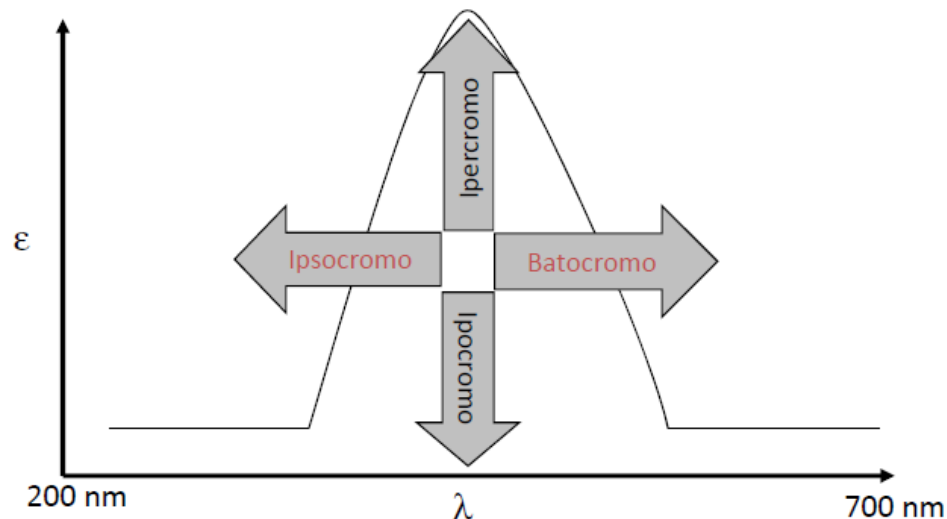


## Effetto dei sostituenti /della coniugazione

Quando in una molecola sono presenti due o più cromofori in coniugazione diretta tra loro si assiste ad un marcato **effetto batocromico/ipsocromico** quasi sempre accompagnato da un **effetto ipercromico/ipocromico** attribuibile alla maggiore/minore facilità della transizione elettronica.

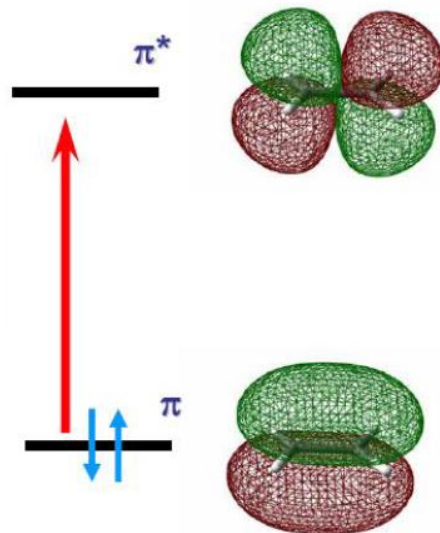
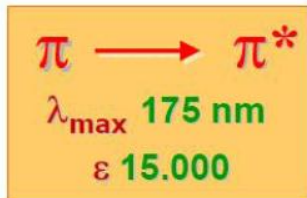
I sostituenti possono avere uno dei seguenti quattro effetti su un cromoforo

- Effetto batocromo (red shift) – spostamento verso  $\lambda$  maggiori (energia minore)
- Effetto Ipsocromo (blue shift) – spostamento verso  $\lambda$  minori (energia maggiore)
- Effetto Ipercromo – Aumento di  $\epsilon$  (maggiore intensità)
- Effetto Ipocromo – Diminuzione di  $\epsilon$  (minore intensità)
- Effetto Auxocromo – contemporaneo aumento di  $\lambda$  ed  $\epsilon$



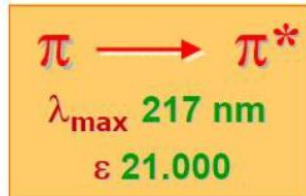
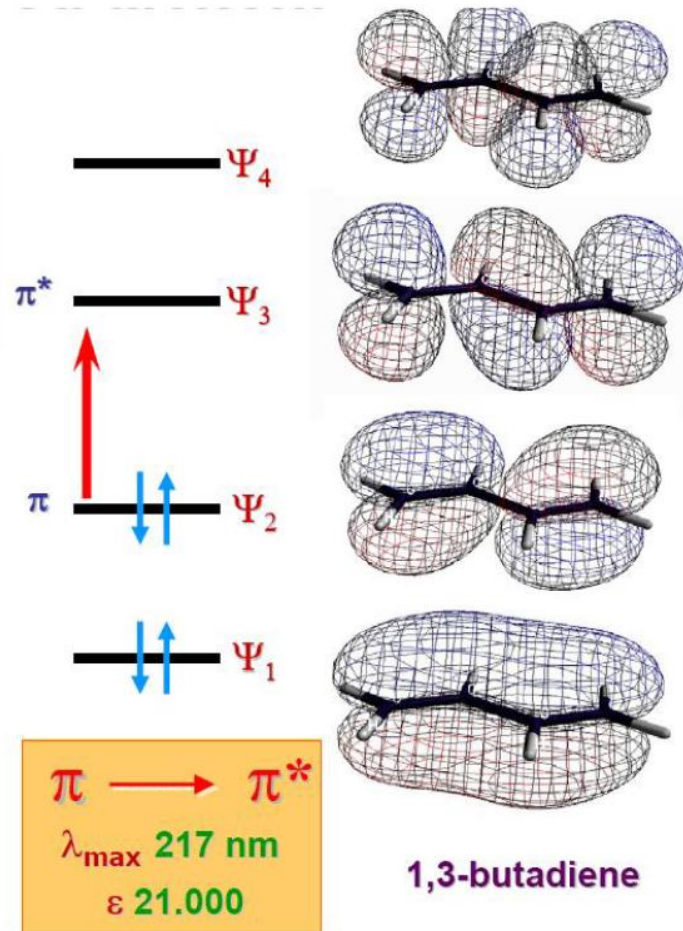


# Effetto della coniugazione



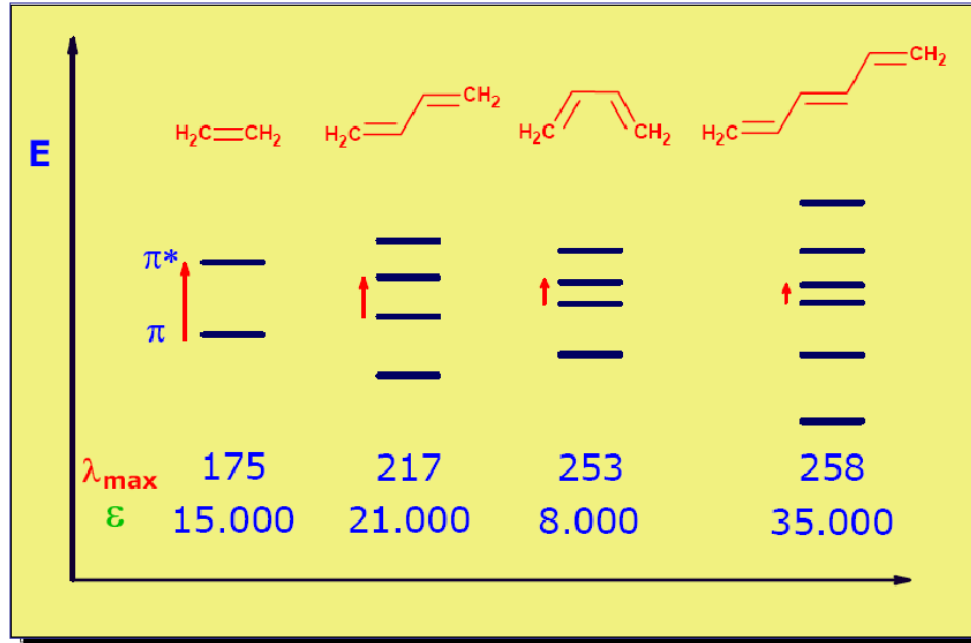
Etilene

l'aumento della facilità della transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  è correlata ad una minore richiesta energetica per la transizione



1,3-butadiene

# Effetto della coniugazione



**Coniugazione più estesa:**

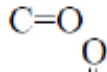
✓ assorbimento a lunghezze d'onda maggiori

✓ assorbimento più intenso

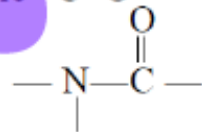
✓ aumento di  $\epsilon$  conseguenza di un aumentato momento dipolare

# Cromofori importanti in molecole biologiche

- Gruppo carbonile



- Gruppo peptidico



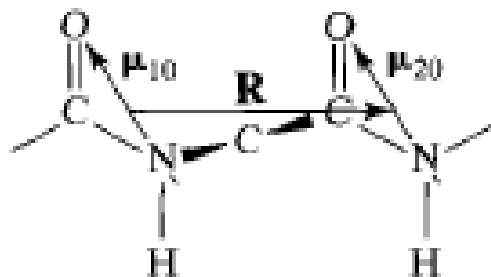
- Doppi legami coniugati in polieni lineari (caroteni, retinolo) e ciclici (derivati porfirinici, amminoacidi aromatici, basi degli acidi nucleici)
- Ioni di metalli di Transizione in metallo-proteine: Mn, Fe, Co, Cu, Mo, V

## Uso frequente della spettroscopia UV-visibile

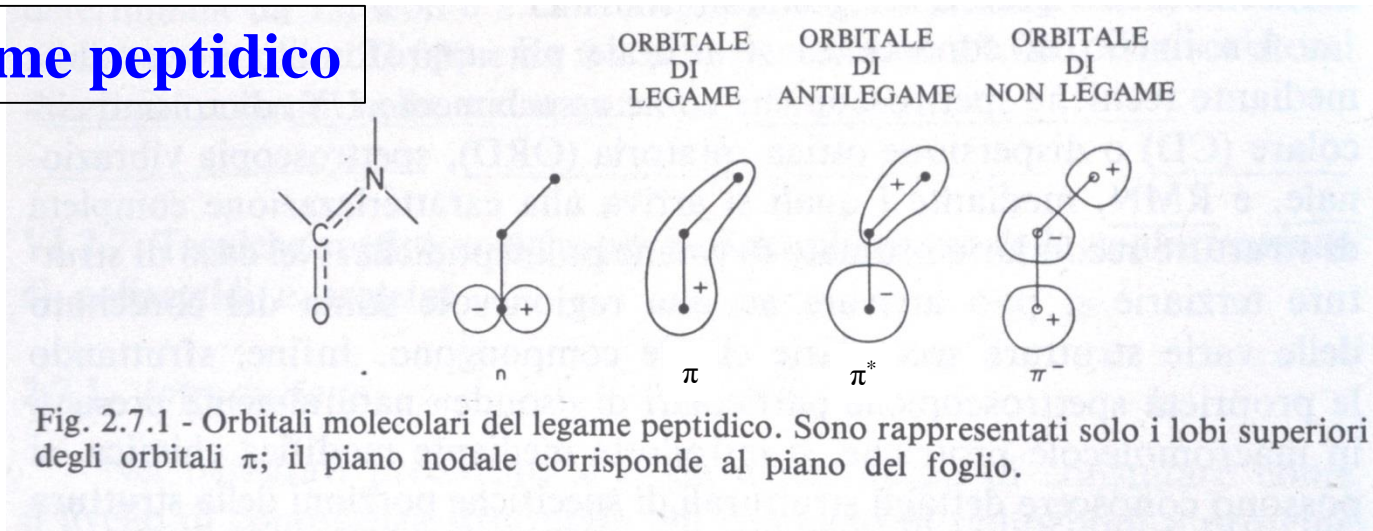
- Misura della concentrazione di acidi nucleici mediante  $A_{260}$
- Misura della concentrazione di proteine mediante  $A_{280}$
- **Transizioni conformazionali !**

## Legame peptidico

The energy of interaction between the  $\pi\pi^*$  transition dipoles of an amide dimer depends on the relative orientation of the dipole vectors and the vector distance between them.



# Legame peptidico



Banda 210-220 nm

transizione  $n \rightarrow \pi^*$

**debole**

Banda ~190 nm

transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$

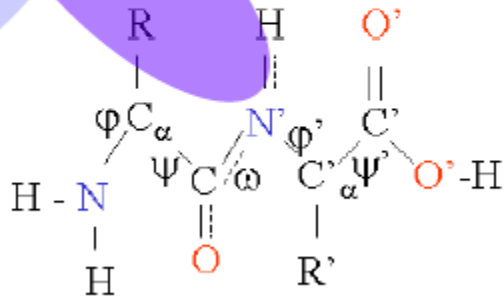
**forte**

$$\mu_e = \int \varphi^0 M \varphi^* dt = \langle i | \mu | f \rangle$$

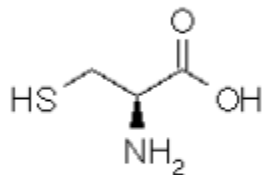
Assorbimento se e solo se:

$$\mu_e \neq 0$$

# Cromofori nelle proteine

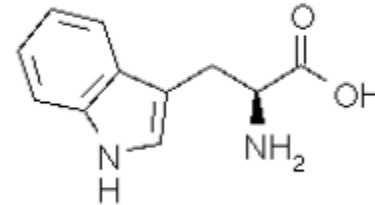


Il legame peptidico  
(214 nm, lontano UV)



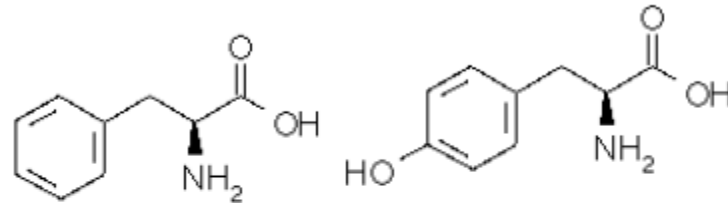
**cys** c Cystein

Ponte disolfuro  
(250 nm)



**trp** w Tryptophan

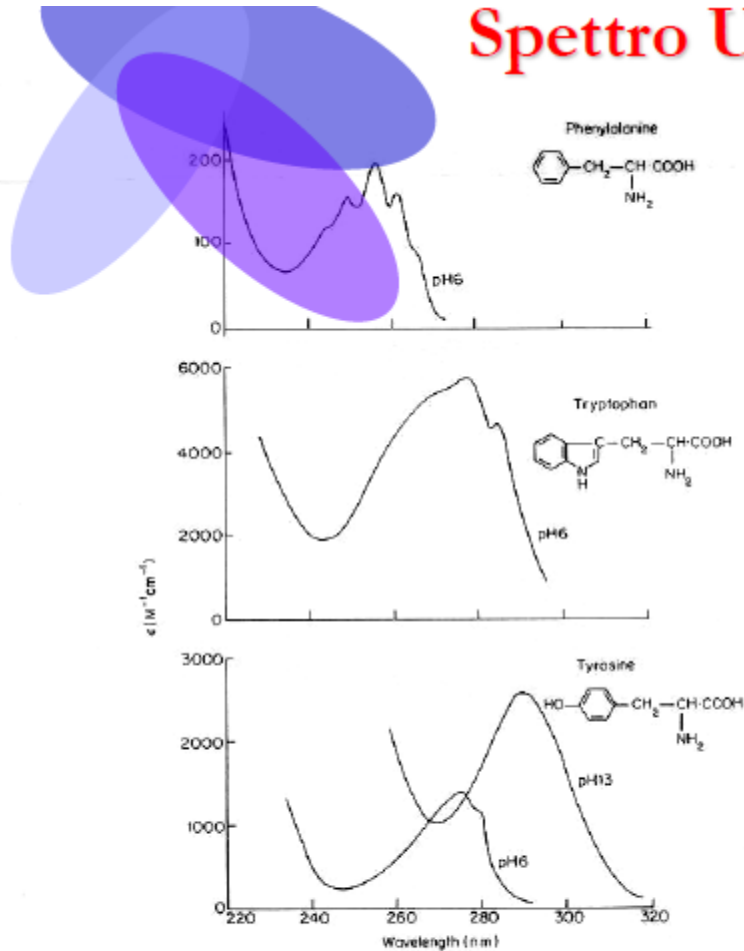
Anello aromatico  
(280 nm, vicino UV)



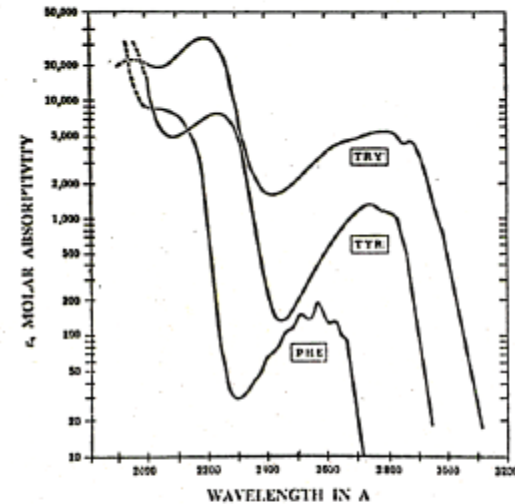
**phe** f Phenylalanin

**tyr** y Tyrosin

# Spettro Ultravioletto delle proteine



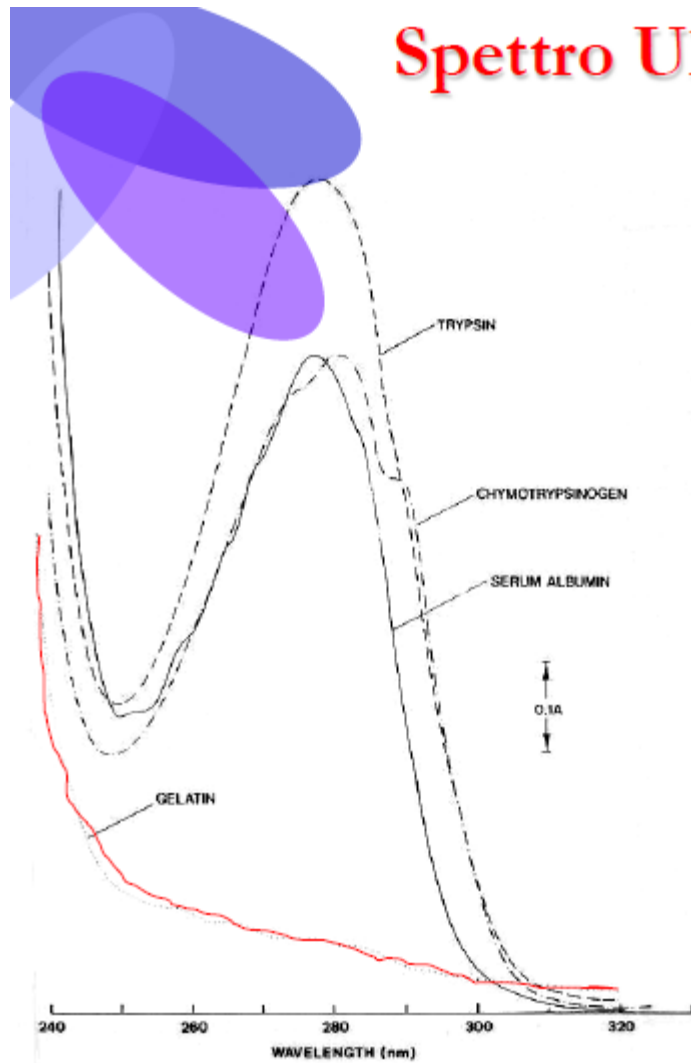
ABSORPTION SPECTRA OF THE AROMATIC AMINO ACIDS AT pH 6



La banda della fenilalanina è la meno intensa e si osserva a minori lunghezze d'onda. Il suo contributo è completamente oscurato da quello di tirosina e triptofano, quando sono presenti questi residui.

Fig. Ultraviolet absorption spectra of amino acids and proteins. A. UV spectra of aromatic amino acids. Phenylalanine and tryptophane at pH 6, tyrosine at pH 6 and pH 13 (tyrosinate): see Table 3 (Brown, 1980). Reproduced by permission from Brown (1980), *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*. Copyright: Academic Press Inc. (London) Ltd.

# Spettro Ultravioletto delle proteine



Spettro di assorbimento di quattro proteine:

- La **tripsina** ha un alto contenuto in tirosina,
- l' **albumina** ha un alto contenuto in fenilalanina,
- il **chimotripsinogeno** ha un alto contenuto in triptofano
- la gelatina (**collagene**) ha un basso contenuto in tutti e tre questi aminoacidi.



# Spettro Ultravioletto delle proteine

Tipicamente per poter quantificare la concentrazione di una proteina viene usata la regione del **vicino UV** piuttosto che il lontano UV in quanto molti solventi assorbono o diffondono in questa ultima regione spettrale, pertanto interferendo con l'assorbimento del cromoforo amidico

Gli amino acidi aromatici hanno un coefficiente di estinzione molare ben caratterizzato nell'intervallo 250-300 nm. Pertanto, se si conosce il numero di tirosine o triptofano nella proteina, si può calcolare un coefficiente di estinzione per la proteina ad una determinata lunghezza d'onda ed usare questo per misurare la concentrazione della proteina in soluzione

$$\begin{aligned}\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{tirosina}) &= 1280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \\ \epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{triptofano}) &= 5690 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}\end{aligned}$$

$$A = A_{\text{tyr}} + A_{\text{trp}} + A_{\text{phe}} = \epsilon l c$$

$$\epsilon = n_{\text{tyr}} \epsilon_{\text{tyr}} + n_{\text{trp}} \epsilon_{\text{trp}} + n_{\text{phe}} \epsilon_{\text{phe}}$$

Assorbimento a 190-200 nm  
(legame peptidico)

**Table 9.3** Extinction Coefficient at 190 nm for Some Proteins

<b>Protein</b>	<b><math>\epsilon(190) \times 10^{-3}</math></b>
$\alpha$ -Chymotrypsin	9.69
Cytochrome c	9.72
Elastase	10.29
Hemoglobin	9.62
Lactate dehydrogenase	8.51
Lysozyme	11.46
Myoglobin	9.15
Papain	10.10
Ribonuclease	9.64

# Transizione conformazionale

Nella figura è mostrato come lo spettro del polipeptide poli-L-lisina possa modificarsi per:

- l'effetto di un aumento di pH che induce la formazione dell'  $\alpha$ -elica da una struttura a matassa

- l'effetto di un aumento di temperatura che induce il polipeptide in  $\beta$ -foglietto.

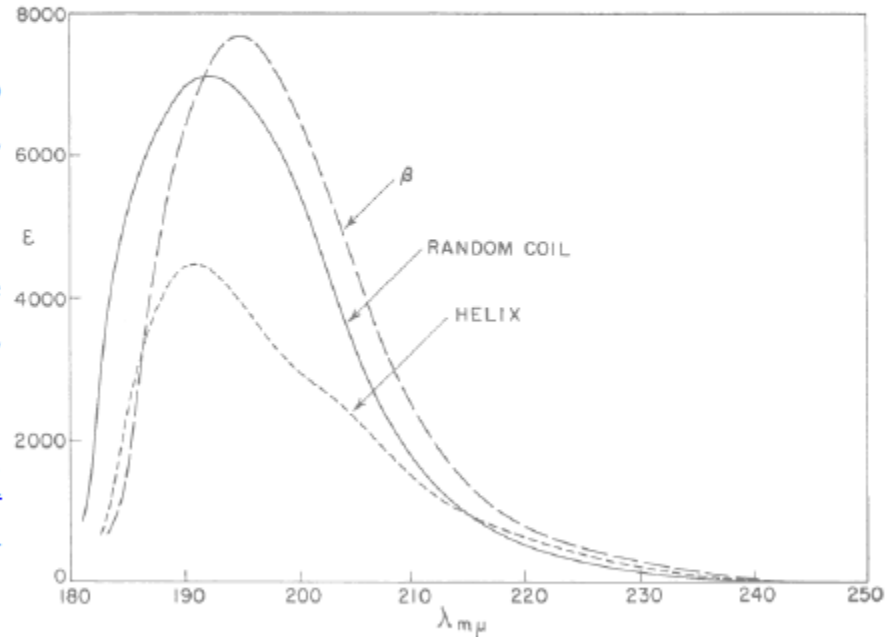
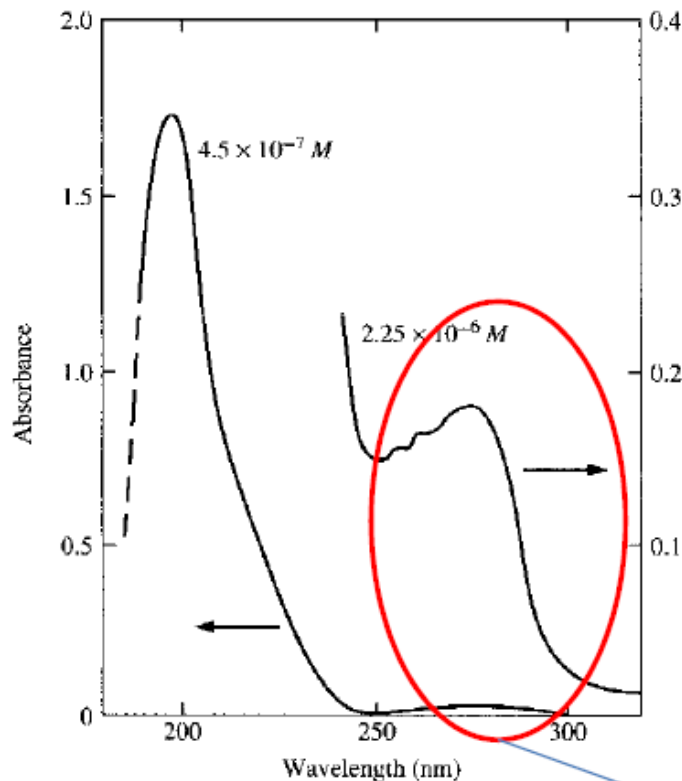


FIG. 2.—Ultraviolet absorption spectra of poly-L-lysine hydrochloride in aqueous solution: random coil, pH 6.0, 25°; helix, pH 10.8, 25°;  $\beta$ -form, pH 10.8, 52°.

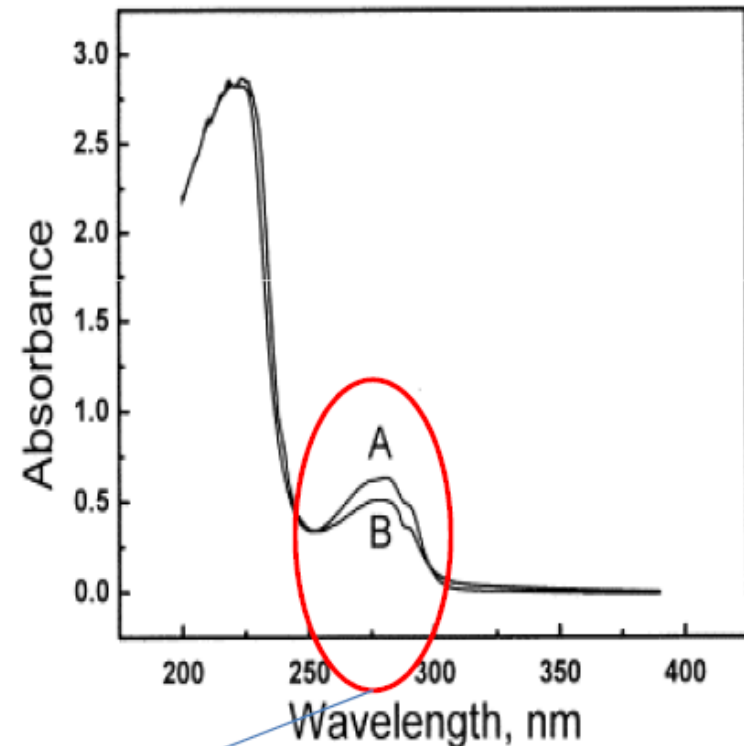
Il fenomeno può essere usato nello studio dei processi di **denaturazione** e **rinaturazione**, sfruttando i diversi coefficienti di assorbimento, per determinare quantitativamente le frazioni di forma nativa e denaturata.

# Spettri UV-Vis di proteine

Albumina di siero bovino (BSA)



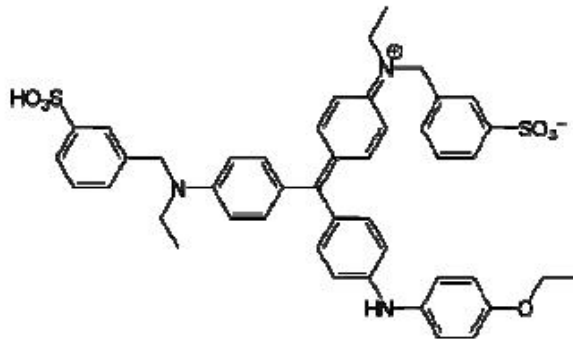
Lisozima da albume d'uovo



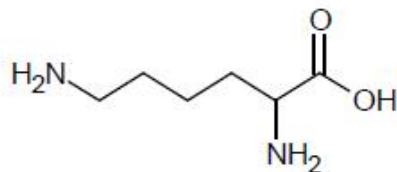
La misura dell'assorbanza alla  $\lambda$  nel range 260-280 nm permette la determinazione quantitativa di proteine in soluzione

# Saggio di Bradford

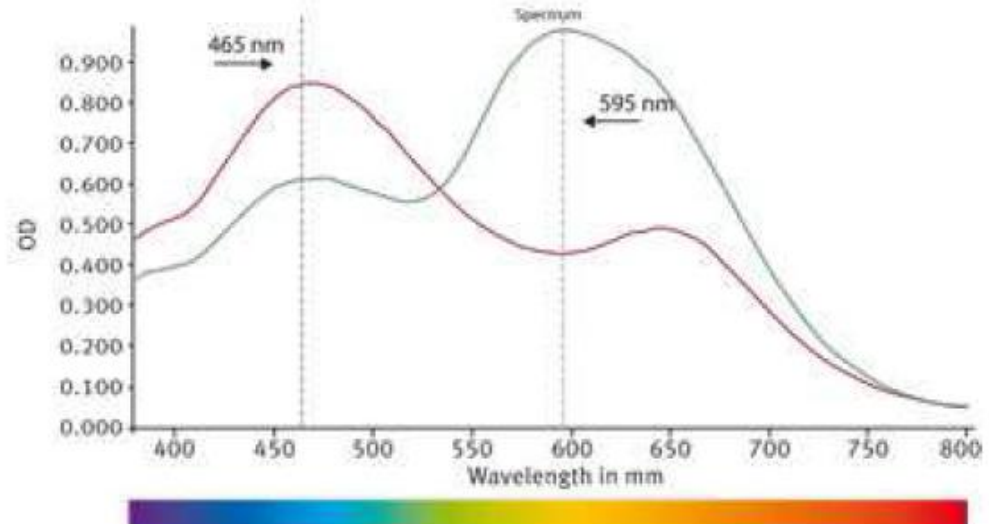
Il metodo di Bradford permette di determinare la concentrazione di una proteina per reazione tra i gruppi amminici delle lisine e un colorante (cromoforo) Coomassie blue. In seguito a una taratura con una proteina usata come standard (BSA) è possibile determinare la concentrazione incognita di proteina.



Coomassie brilliant blue



Lisina



*Spettro del "Coomassie® Brilliant Blue" libero (linea rossa) e legato ai residui amminici (linea verde)*

*Il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G- 250 alle proteine provoca uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide*

# Saggio di Bradford

- Tale colorante forma **forti complessi non covalenti** con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con gruppi aminici e carbossilici e tramite forze di van der Waals
- Il colorante è preparato come soluzione *stock* in acido fosforico
- Il metodo è un semplice procedimento costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina **l'assorbanza a 595 nm**
- La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione, pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica. In genere quantità uguali di proteine differenti legano la stessa quantità di colorante → **il saggio è indipendente dal tipo di proteina**

# Saggio di Bradford

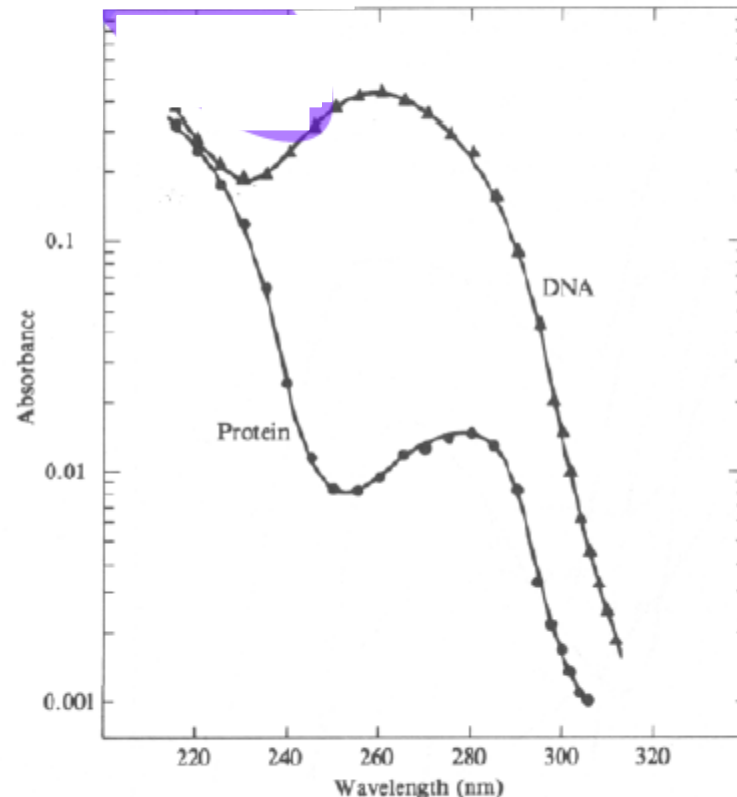
## VANTAGGI

- Semplicità di preparazione del reattivo
- Sviluppo del colore immediato
- Stabilità del complesso
- Elevata sensibilità (fino a **22 µg/ml**)
- Il saggio è compatibile con la maggior parte dei tamponi comuni, degli agenti denaturanti come guanidina·HCl 6M e urea 8 M e dei preservanti come sodio azide

## SVANTAGGI

- Il reagente colora le cuvette ed è piuttosto difficile da rimuovere
- La quantità di colorante che si lega alla proteina dipende dal contenuto in aminoacidi basici → ciò rende difficile la scelta di uno *standard*
- Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida

## Spettro Ultravioletto di Acidi Nucleici



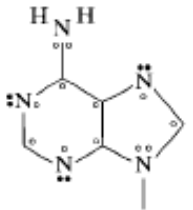
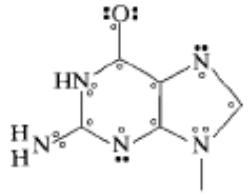
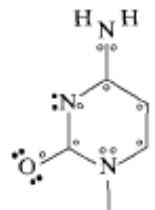
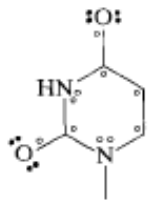
Il forte assorbimento nel vicino UV degli acidi nucleici è determinato quasi esclusivamente dalle basi pirimidiniche e puriniche.

Infatti gli zuccheri e i gruppi fosfato hanno assorbimenti a  $< 150$  nm.

Le basi presentano sistemi delocalizzati in anelli eterociclici, e le transizioni sono di tipo  $\pi-\pi^*$ .

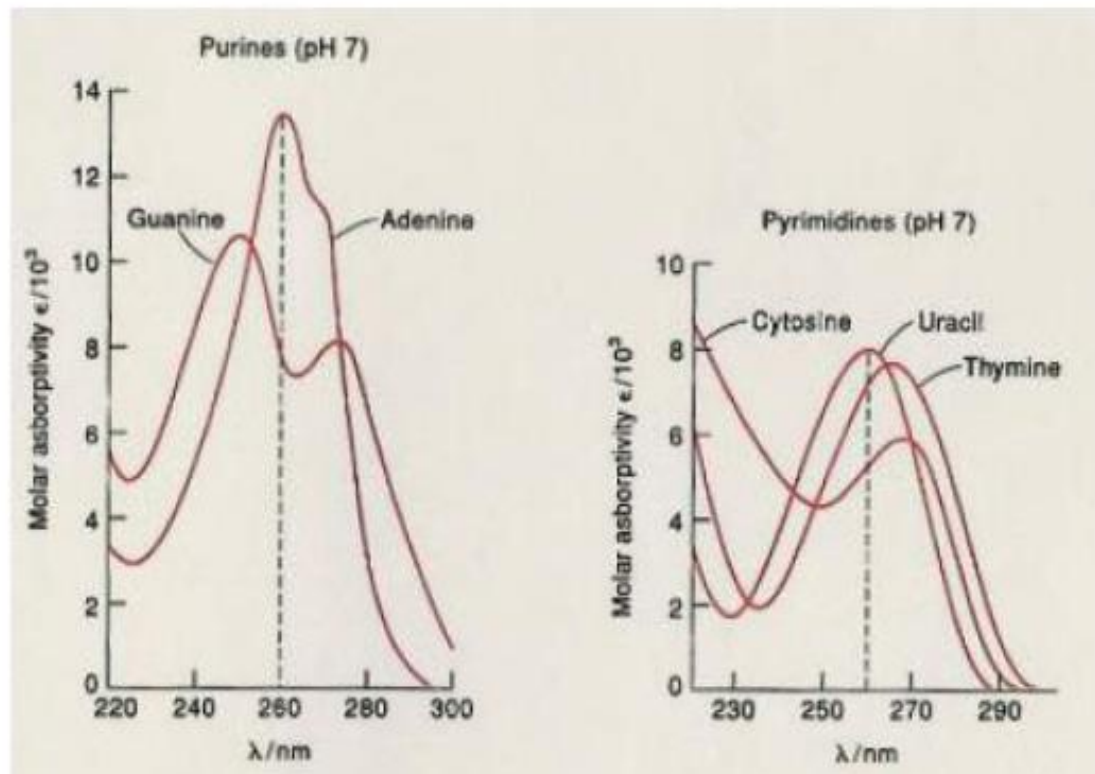


**Table 9.1** Electronic Structure of the Bases

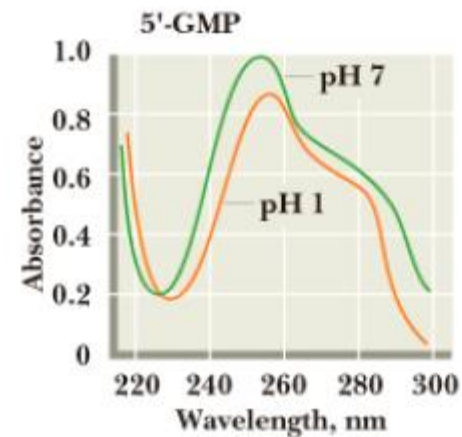
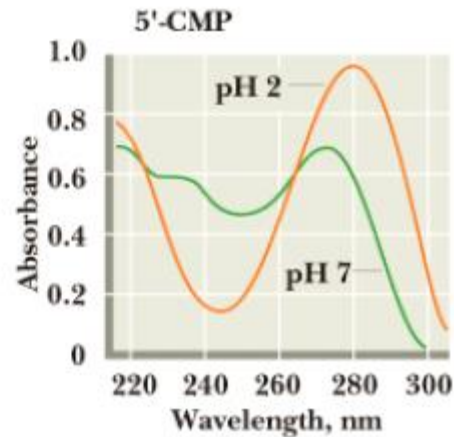
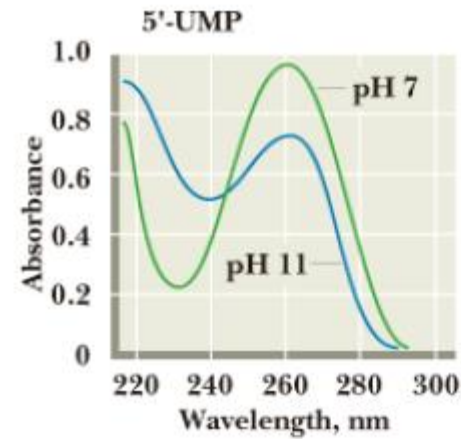
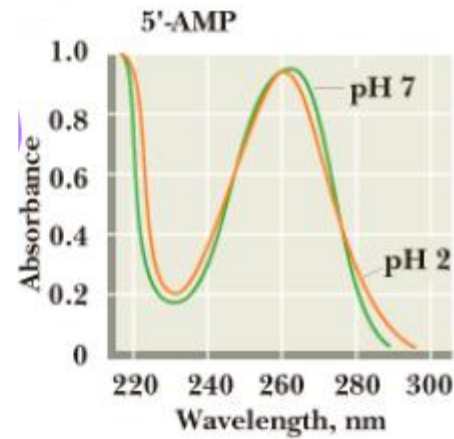
Compound	Structure	Number of $\pi$ Orbitals	Number of $\pi$ Electrons	Number of Filled $\pi$ Orbitals	Number of Unfilled $\pi$ Orbitals
Adenine		10	12	6	4
Guanine		11	14	7	4
Cytosine		8	10	5	3
Uracil (Thymine)		8	10	5	3

# Spettro Ultravioletto di Acidi Nucleici

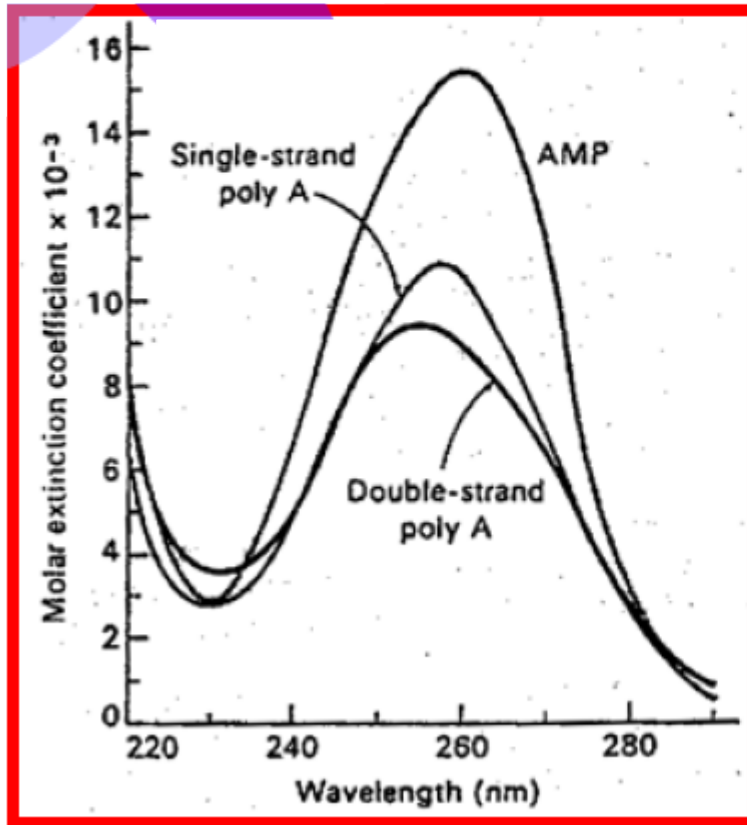
Tutti gli spettri delle basi mostrano un forte assorbimento intorno a **260 nm**.



# Spettro Ultravioletto di Acidi Nucleici



# Ipercromicità/Ipercromicità



$A_{(260)}$

DNA doppio filamento 1.00

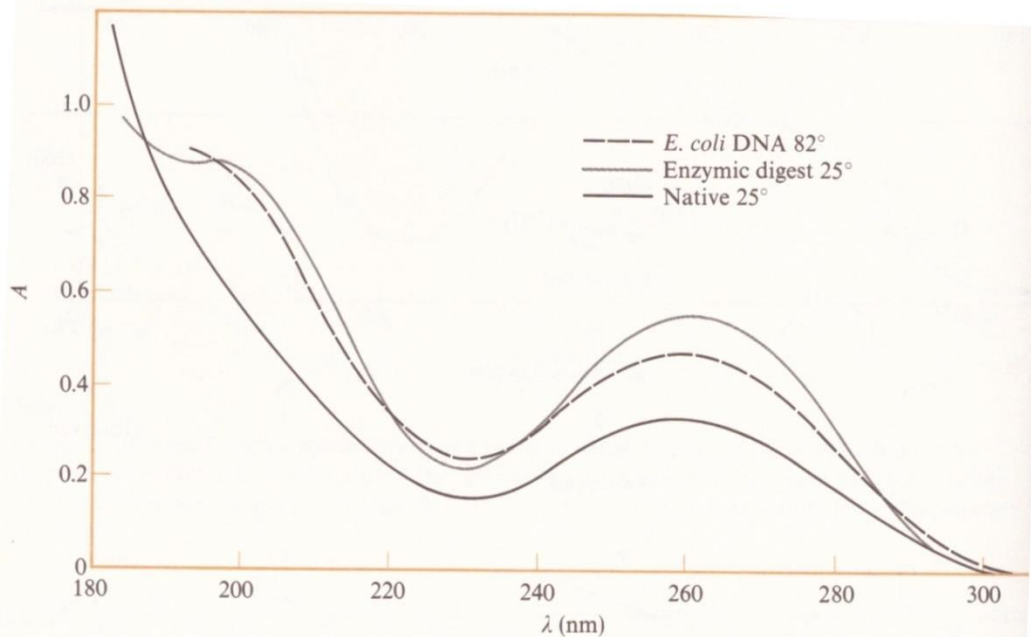
DNA singolo filamento 1.37

Basi libere 1.67

In generale, gli acidi nucleici hanno un assorbimento inferiore alla somma delle assorbanze dei nucleotidi individuali

**Effetto ipocromico !**

$$(\%) \text{ ipercromicità} = \frac{A_{ss}(\text{DNA}_{\text{fuso}}) - A_{ss}(\text{DNA}_{\text{nativo}})}{A_{ss}(\text{DNA}_{\text{nativo}})} * 100$$

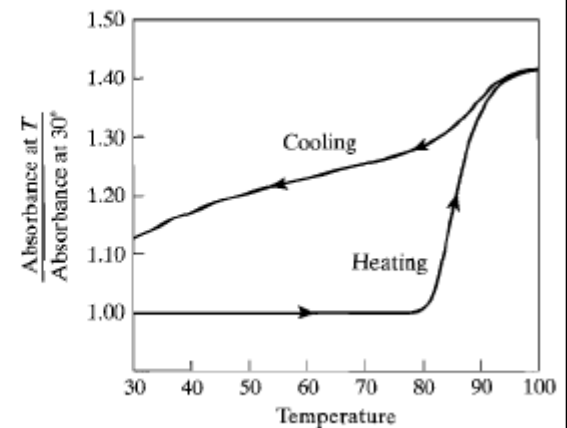


**Figure 7-14**


*Spectrum of DNA as a function of temperature. The enzymic digest should result in a solution of only mononucleotides and possibly a few short oligomers. Note that the high-temperature spectrum is fairly close to the digested spectrum. [After D. Voet, W. B. Gratzer, R. A. Cox, and P. Doty, *Biopolymers* 1:193 (1963).]*

L'ipercromicità viene utilizzata per seguire le transizioni conformazionali in funzione della T

$\lambda=260 \text{ nm}$



**Figure 9.23** The thermal denaturation of DNA as measured through electronic absorption spectroscopy.



L'effetto ipercromico può essere spiegato in base alla **configurazione elicoidale dei polimeri del nucleotide.**

In una struttura così regolarmente impacchettata i cromofori non possono essere considerati residui "isolati", indipendenti gli uni dagli altri.

Lo spostamento elettronico che ha luogo quando una base assorbe un quanto di energia è sentito anche dalle basi vicine in conseguenza alla modificazione del campo elettrico. Se l'interazione è forte, diventa impossibile parlare di un assorbimento "localizzato" in un residuo particolare.



**L'effetto ipercromico è causato anche dalla presenza di interazioni intermolecolari.**

Una regola generale prevede che

**MODIFICAZIONI CONFIGURAZIONALI CHE  
NON CAMBIANO  
LA STRUTTURA ELETTRONICA  
NON MODIFICANO  
L'ASSORBIMENTO TOTALE**




## Denaturazione del DNA

Sotto l'azione di vari agenti esterni come valori estremi di pH, aumento della temperatura, aggiunta al mezzo acquoso di particolari reagenti, il DNA in soluzione può andare incontro a significative modificazioni strutturali che ne cambiano l'aspetto, la funzionalità e le caratteristiche, **passando dalla doppia elica regolare a uno stato disordinato in cui i filamenti complementari si separano e la struttura secondaria viene persa.**

**(denaturazione)**

Durante un processo di denaturazione non si rompe alcun legame covalente, ma si assiste alla sola **separazione dei due filamenti della doppia elica**: in altre parole, i ponti idrogeno tra le coppie di basi complementari vengono spezzati e diminuiscono le interazioni tra basi adiacenti.





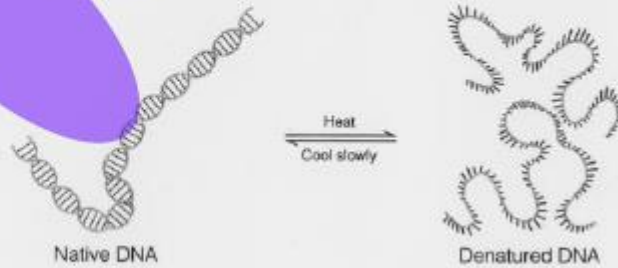
## Denaturazione termica del DNA

La denaturazione termica degli acidi nucleici avviene in un intervallo di temperatura piuttosto ristretto e provoca cambiamenti significativi delle proprietà fisiche della macromolecola.

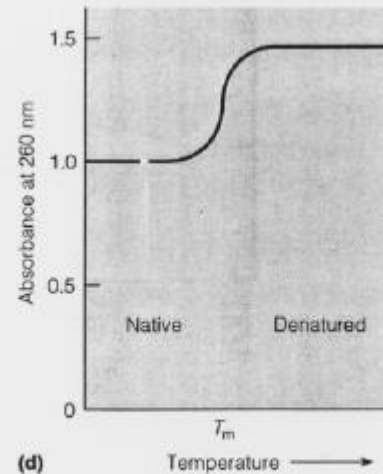
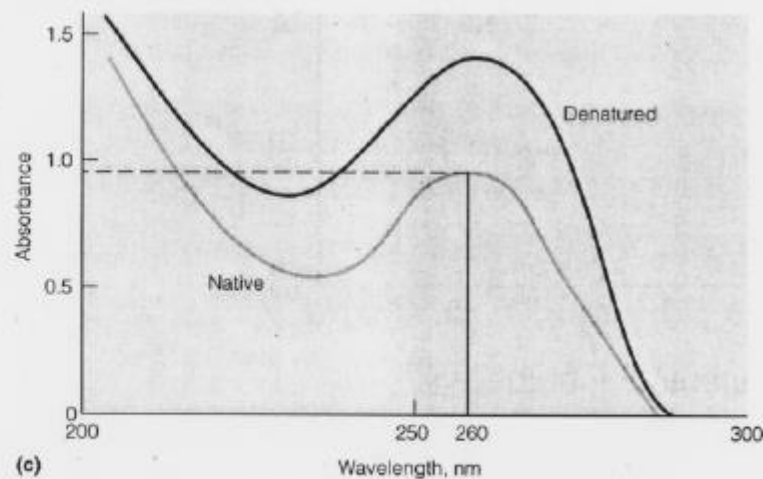
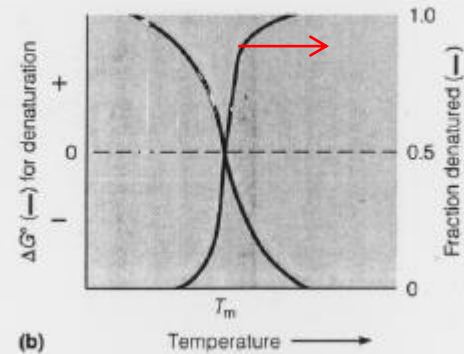
Questa particolare transizione ordine-disordine può essere facilmente osservata seguendo l'aumento dell'assorbimento ottico a 260 nm in funzione dell'aumento della temperatura .

La curva sperimentale dell'assorbanza in funzione della temperatura può essere analizzata per ottenere informazioni termodinamiche relative al processo in esame.

# Denaturazione del DNA



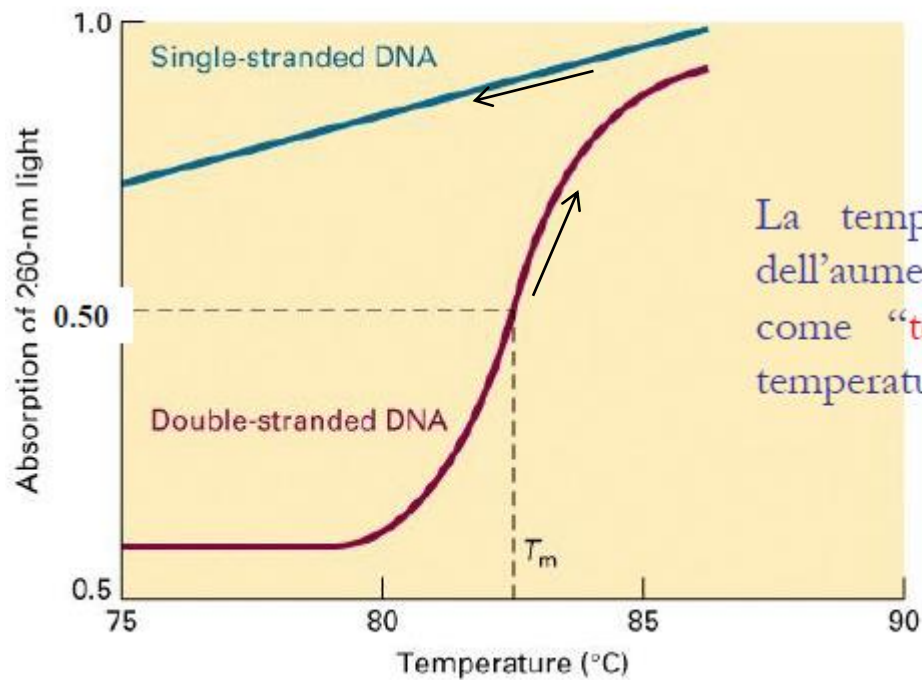
(a)



# Denaturazione termica del DNA



(a)



La temperatura corrispondente a metà dell'aumento osservato nell' $A_{260}$  è definita come “temperatura di *melting*”,  $T_m$  o temperatura di fusione del DNA.



# Denaturazione termica del DNA

Molti sono i fattori che influenzano il punto di melting del DNA:

- **Lunghezza della molecola:** DNA più lunghi  $\Rightarrow T_m$  più elevate;
- **Contenuto delle basi:** maggiore % GC  $\Rightarrow T_m$  più elevate
- **Sequenza delle basi:** non solo il contenuto, ma anche l'ordine con cui le basi si presentano nella sequenza polinucleotidica condiziona la stabilità del DNA;
- **Forza ionica:** a più elevata forza ionica, è presente un maggior numero di ioni positivi che schermano la carica negativa lungo lo scheletro del DNA. In questo modo, le forze repulsive tra catene diminuiscono e, di contro, aumenta la  $T_m$ ;

## Stabilizzazione: impilamento delle basi

**Table 24-2** Stacking Energies for the Ten Possible Dimers in B-DNA

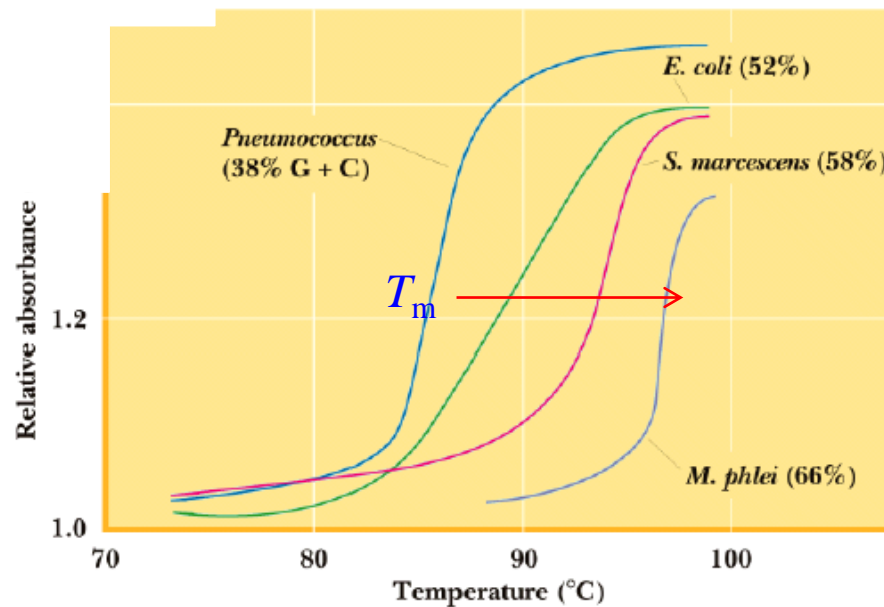
Stacked Dimer	Stacking Energy (kJ · mol <sup>-1</sup> )
C · G	-61.0
G · C	-61.0
C · G	-44.0
A · T	-44.0
C · G	-41.0
T · A	-41.0
G · C	-40.5
C · G	-40.5
G · C	-34.6
G · C	-34.6
G · C	-28.4
A · T	-28.4
T · A	-27.5
A · T	-27.5
G · C	-27.5
T · A	-27.5
A · T	-22.5
A · T	-22.5
A · T	-16.0
T · A	-16.0

L'energia di **stacking** in una doppia elica dipende dal contenuto in C-G e dalla sequenza !




➤ **Valori di pH:** valori estremi di pH possono ionizzare le basi azotate e rompere i legami idrogeno. Al di fuori del range  $5 < \text{pH} < 9$  la  $T_m$  decresce bruscamente;

➤ **Contenuto delle basi:** maggiore % GC  $\Rightarrow T_m$  più elevate



# Denaturazione delle proteine



Si può studiare la denaturazione di una proteina attraverso il suo spettro UV?

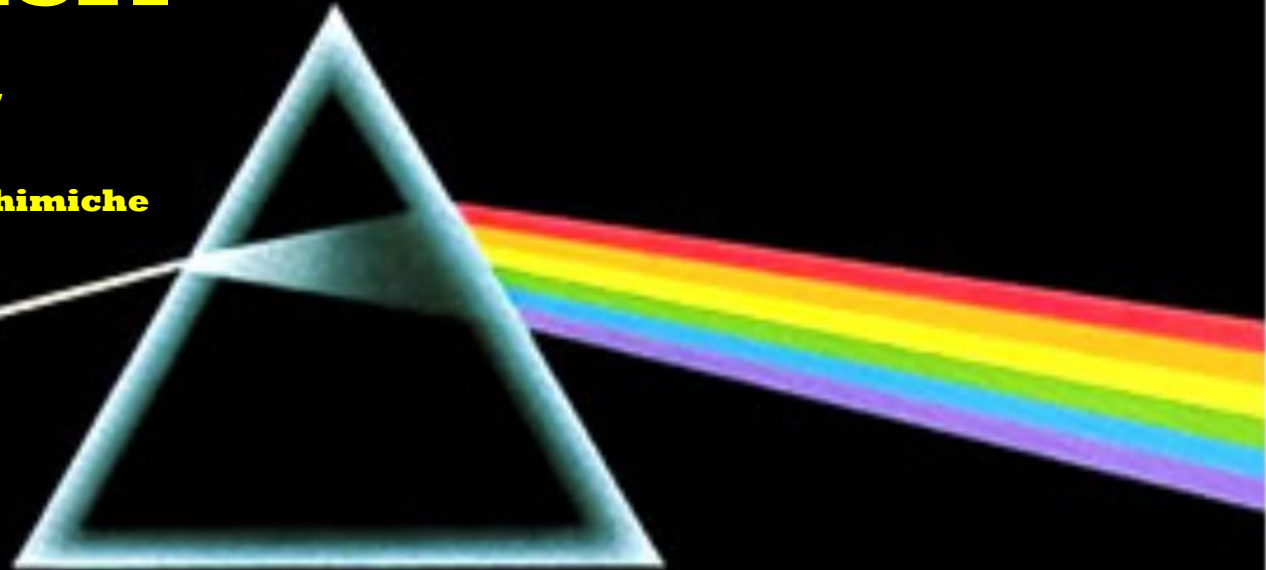
Modificazioni nella struttura secondaria di una proteina sono comunemente osservate attraverso il suo spettro UV, in quanto l'assorbimento degli aminoacidi aromatici e dei legami peptidici è significativamente influenzato dall'ambiente locale.

Pertanto, lo spettro UV di una proteina denaturata differisce da quello della stessa proteina nella forma nativa. Tuttavia, le modificazioni spettrali sono generalmente di piccola entità tanto che questo metodo non è quasi mai usato per questo tipo di studio. Al contrario, la denaturazione di una proteina può essere più sensibilmente monitorata attraverso il dicroismo circolare

**Corso di**  
**Proprietà di**  
**Biopolimeri**

***Prof. R. URBANI***

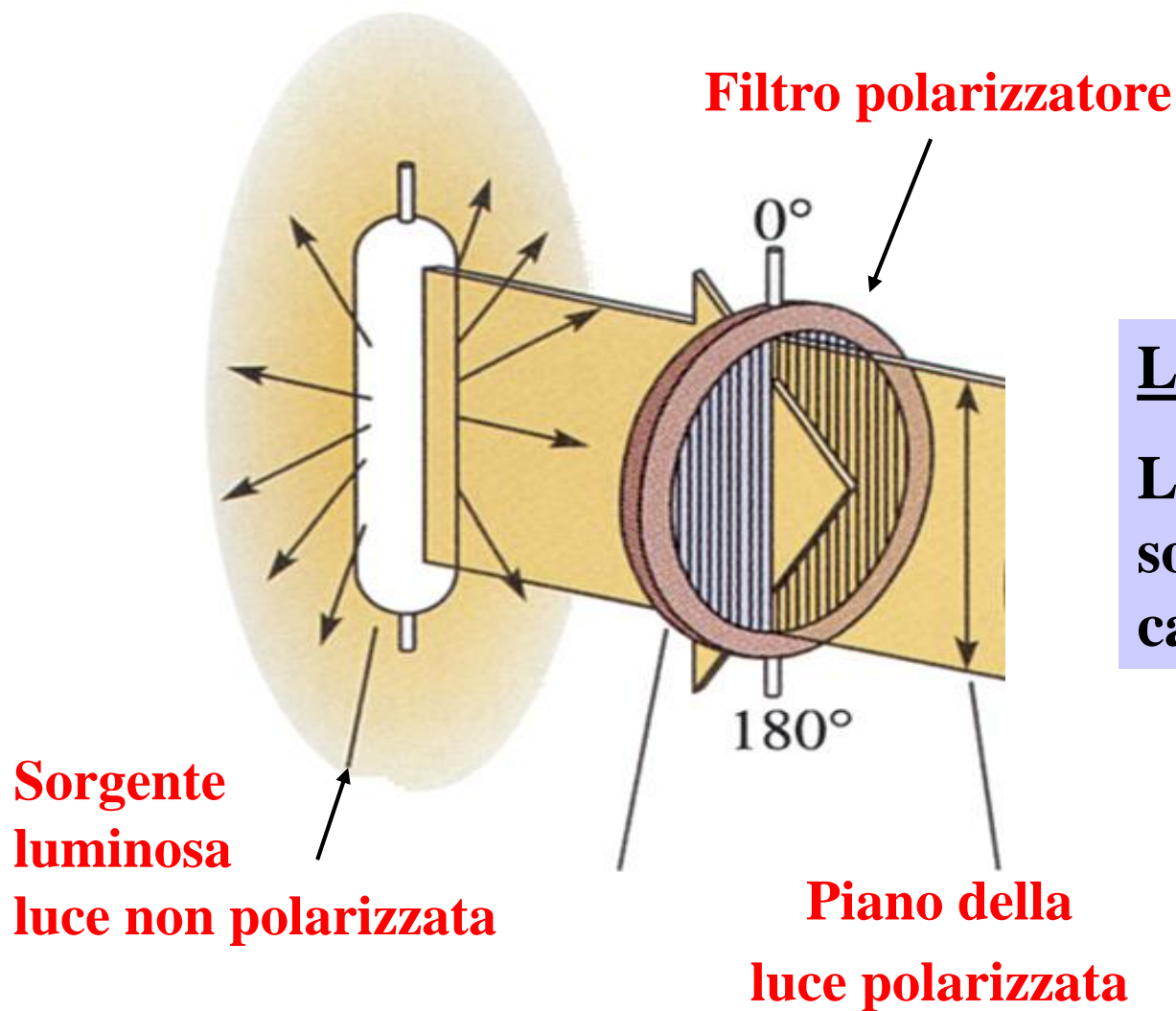
**Dipartimento di Scienze Chimiche  
e Farmaceutiche  
a.a. 2021-2022**



**DICROISMO CIRCOLARE**



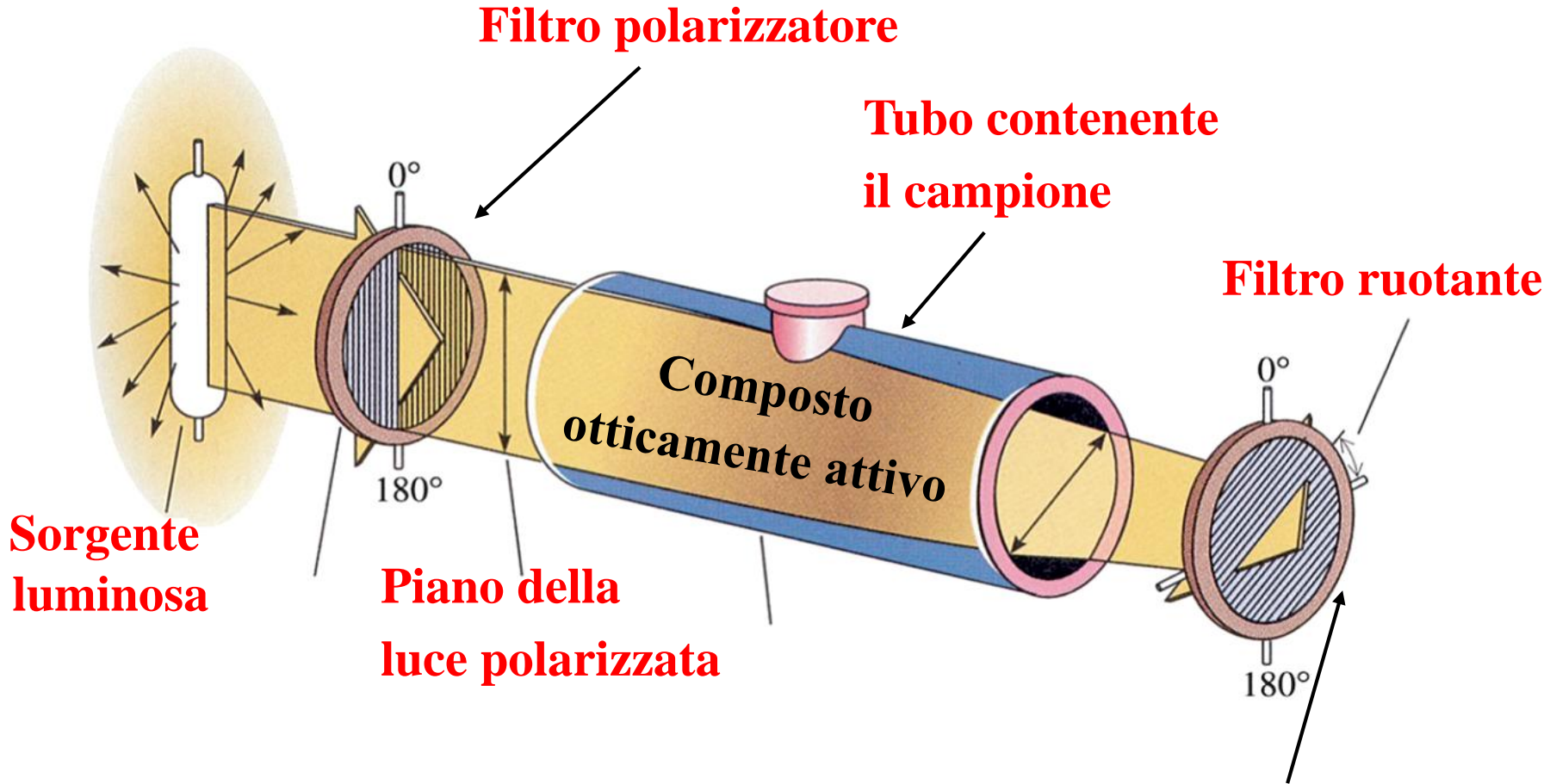
# L'attività ottica



**Luce polarizzata:**

**Luce che vibra in un solo piano (il vettore campo elettrico)**

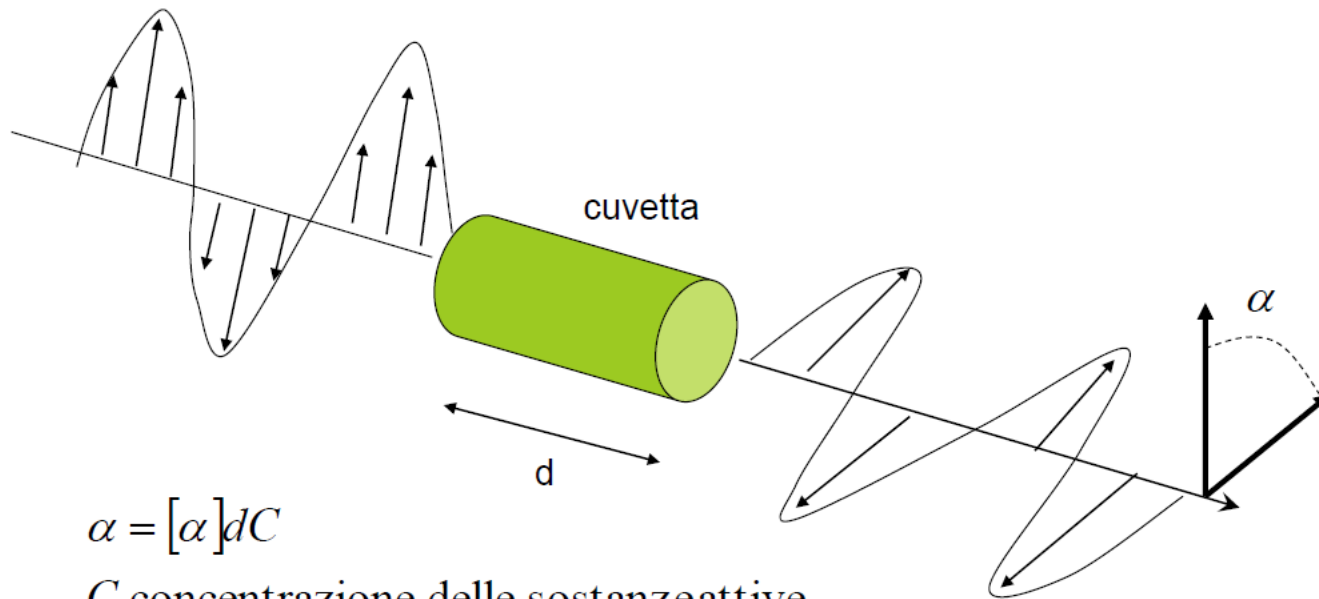
# Polarimetro



Consente di stabilire la rotazione del piano della luce polarizzata

Un enantiomero è un composto otticamente attivo

## Rotazione ottica



$$\alpha = [\alpha]dC$$

$C$  concentrazione delle sostanze attive

$d$  spessore della cuvetta

$[\alpha]$ : rotazione specifica, dipende dalla sostanza

## *Attività Ottica*

Una sostanza è attiva otticamente se ruota la luce polarizzata

Affinchè una sostanza esibisca attività ottica, essa deve essere chirale e un enantiomero deve essere in eccesso rispetto all'altro.

Gli enantiomeri si differenziano per il senso di rotazione del piano della luce polarizzata

# Polarimetria

La **legge di Biot del potere rotatorio specifico delle soluzioni** determina la dipendenza della rotazione dalla concentrazione della sostanza otticamente attiva:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

dove  $l$  è il cammino ottico (in dm) della cella in cui è contenuta la soluzione e  $c$  è la concentrazione in g/ml.

La relazione che lega il potere rotatorio alla temperatura è invece:

$$[\alpha]^t = [\alpha]^{20} + n(t - 20)$$

dove  $t$  è la temperatura in °C e  $n$  una costante di temperatura caratteristica per ciascuna sostanza.

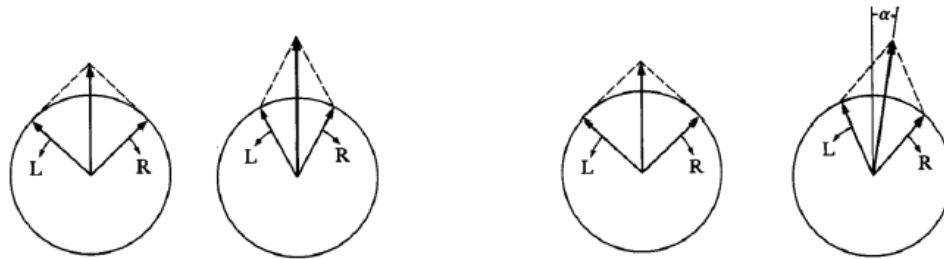
# VIDEO ANIMAZIONI DI OTTICA

<http://cddemo.szialab.org/>

**Attività Ottica** è la differente interazione con luce polarizzata circolarmente a destra e a sinistra

Manifestata da due distinti ma differenti fenomeni:

*Rotazione ottica* – conseguenza di diversi indici di rifrazione tra polarizzazione a destra e a sinistra -- i.e.,  $n_L \neq n_R$  (*birifrangenza circolare*).



Otticamente inattiva,  $n_L = n_R$

Otticamente attiva,  $n_L \neq n_R$

$$\alpha = 1800 / \lambda (n_L - n_R)$$

essendo  $\lambda$  la lunghezza d'onda della luce incidente. In pratica si misura la rotazione specifica  $[\alpha]$  definita dalla relazione:

$$[\alpha] = \alpha 100 / lc$$

Dove  $\alpha$  è misurato in gradi,  $l$  in decimetri e  $c$  in grammi di sostanza otticamente attiva disciolta in 100 mL di soluzione.

# Dispersione ottica rotatoria ORD

- Si misura l'ottica rotatoria a lunghezze d'onda diverse
- Collegata matematicamente al dicroismo circolare
- Tecnica specialistica, CD è molto più usato.



# DICROISMO CIRCOLARE

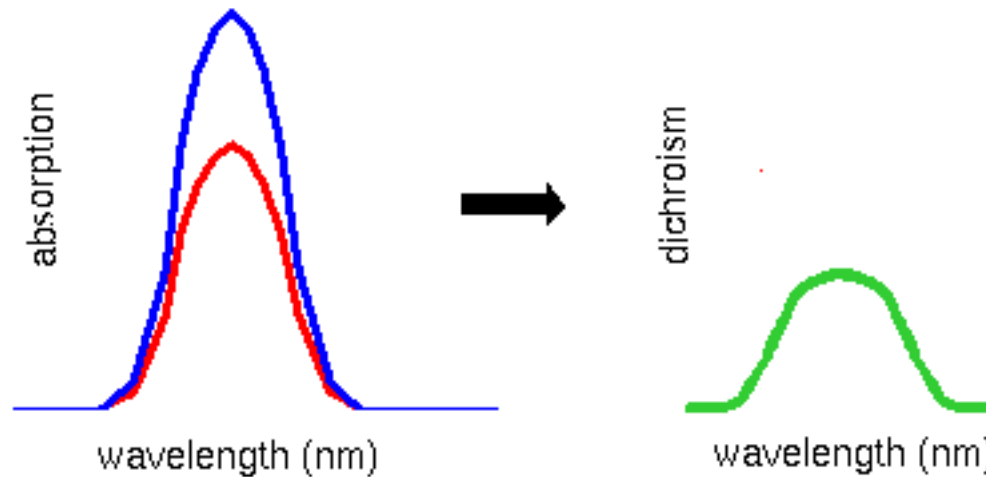
# *Spettroscopia di dicroismo circolare*

- Il fenomeno del **Dicroismo Circolare** (CD) si osserva quando un campione otticamente attivo assorbe in maniera differente la luce circolarmente polarizzata destra da quella circolarmente polarizzata sinistra.
- La differenza di assorbimento è piccola (generalmente 0.0001) che corrisponde ad una **ellitticità** di pochi centesimi di grado.
- Spettri CD relativi a **strutture secondarie** diverse di peptidi, acidi nucleici e polisaccaridi sono diversi e quindi questa tecnica dà informazioni sulla struttura secondaria di macromolecole biologiche.

## Dicroismo circolare e conformazioni

- Nel caso delle molecole biologiche, l'informazione sulla configurazione non è interessante (già si conosce!).
- Vogliamo studiare la conformazione.
- A causa dell'interazione tra cromofori, il dicroismo circolare è molto sensibile anche alla conformazione!

# Dicroismo circolare: il segnale rilevato

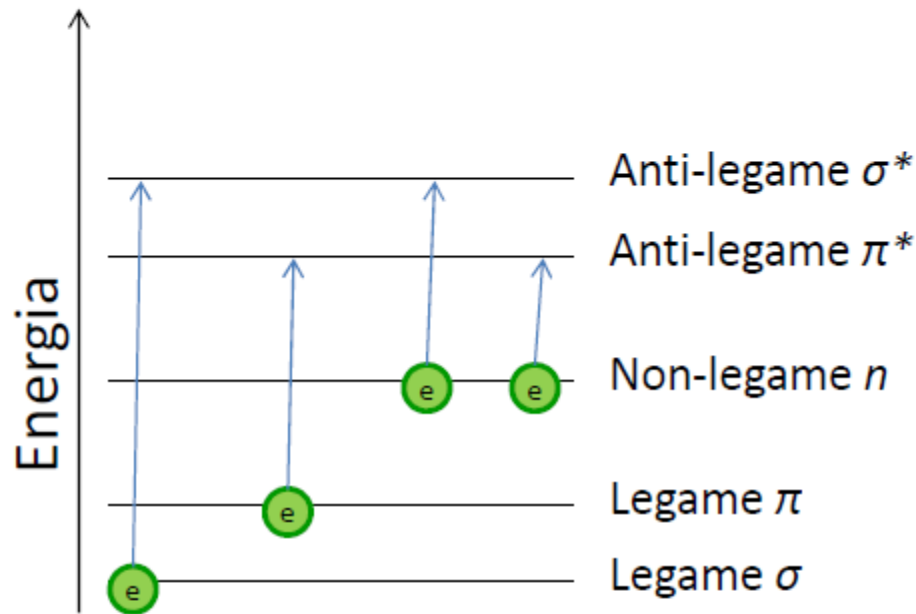


- *Il Dicroismo circolare* è la differenza tra la luce destra e sinistra circolarmente polarizzata ed è misurata in funzione della lunghezza d'onda
- La differenza tra l'assorbimento a **destra** e quello a **sinistra** dà il **dicroismo circolare**

## CD: unità di misura e sensibilità

- La differenza di assorbanza  $A_L - A_R$  è molto piccola (generalmente di circa 0.0001 unità di assorbanza)
- Necessita di apparato di rivelazione molto sensibile ecco perché uno strumento CD è più costoso di uno UV/VIS
- Questa differenza si misura in **ellitticità molare  $\theta_r$**

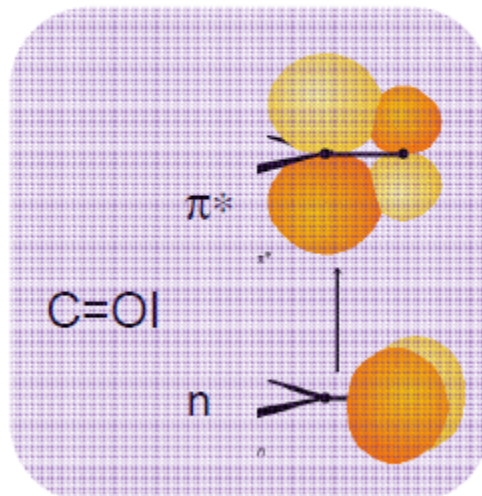
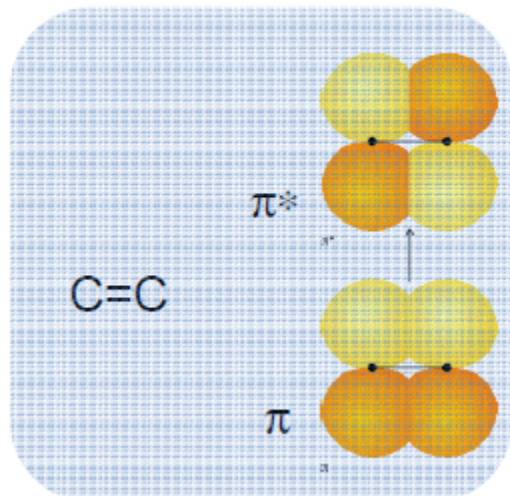
# Transizioni elettroniche ( $\pi$ , $\sigma$ o $n$ )



- $\sigma \rightarrow \sigma^*$  : transizioni altamente energetiche (range tipico  $\sim 125\text{nm}$ )  
Es. legame C-H degli alcani

- $n \rightarrow \sigma^*$  : meno energetiche delle precedenti ( $150\text{-}250\text{ nm}$ ) Es. composti saturi contenenti doppietti solitari (C, N, S, alogeni)

- $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  : la maggior parte dei composti studiati tramite UV-Vis ricade in questo tipo di transizioni. ( $200\text{-}700\text{ nm}$ )

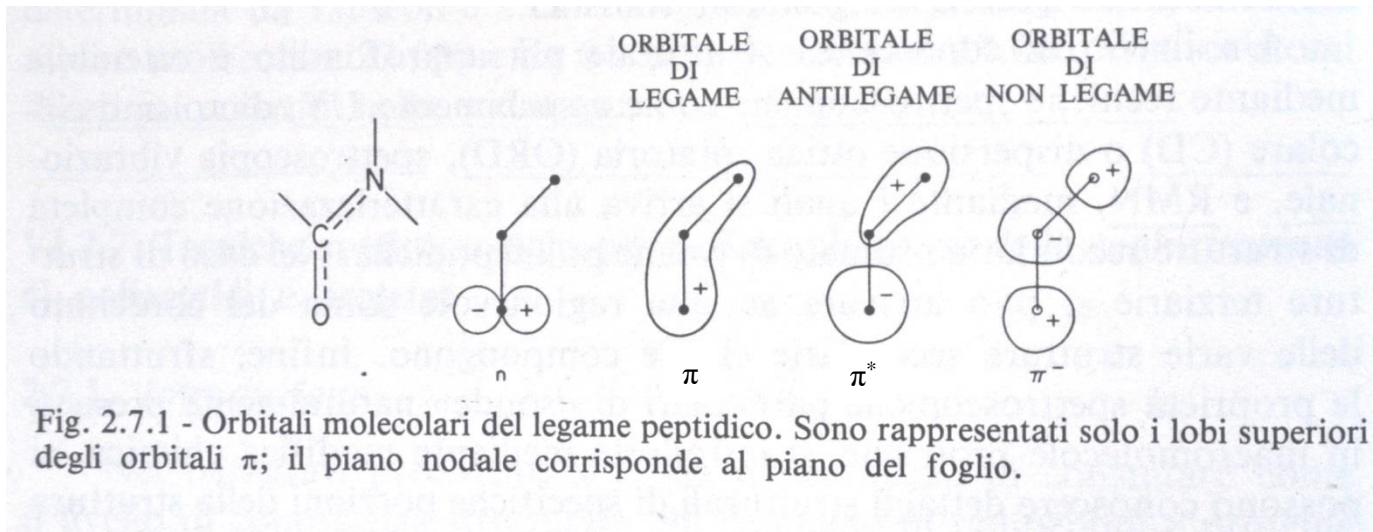


Distribuzioni asimmetriche di carica :

**Permanenti:** gruppi ionizzati-distribuzioni asimmetriche in legami polari

**Indotte:** spostamento di carica indotto da un campo elettrico esterno.

Distribuzioni asimmetriche di carica generano un momento di dipolo  $\mu$



Banda 210-220 nm

transizione  $n \rightarrow \pi^*$

debole

Banda  $\sim 190$  nm

transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$

forte

$$\mu_e = \int \varphi^0 M \varphi^* dt$$

Assorbimento se e solo se:  $\mu_e \neq 0$



$$R^{0k} = \text{Im}(\langle \psi^0 | \vec{\mu} | \psi^k \rangle \langle \psi^k | \vec{m} | \psi^0 \rangle)$$

$$\vec{m} = \frac{e}{2mc} (\vec{r} \times \vec{p}), \quad \vec{p} = \frac{\hbar}{i} \nabla,$$

$$\langle \psi^0 | \vec{\mu} | \psi^k \rangle \quad \langle \psi^k | \vec{m} | \psi^0 \rangle \quad \langle \psi^0 | \vec{\mu} | \psi^k \rangle \langle \psi^k | \vec{m} | \psi^0 \rangle \neq 0$$



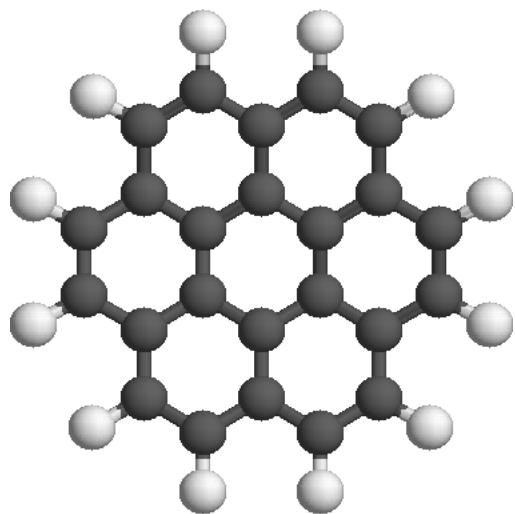
NOTA:

$$\mu = e \sum_i \mathbf{r}_i = \text{operatore dipolo elettrico}$$

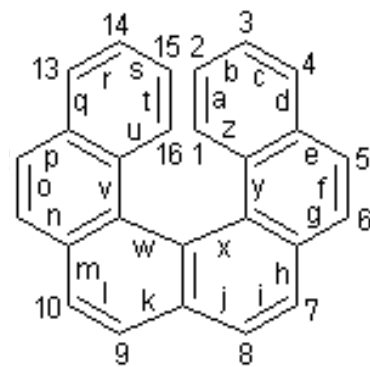
$$\mathbf{m} = \frac{e}{2mc} \sum_i (\mathbf{r}_i \wedge \mathbf{p}_i) = -i \frac{eh}{4\pi mc} \sum_i (\mathbf{r}_i \wedge \nabla_i) = \text{operatore dipolo magnetico}$$

## N.B.

Una struttura ad elica ( *$\alpha$ -elica proteica ma anche pseudoelica di polisaccaridi, doppia elica DNA, ...*) ha **due motivi chirali**: l'elica stessa e i singoli amminoacidi che contengono almeno un carbonio asimmetrico (unica eccezione la glicina).

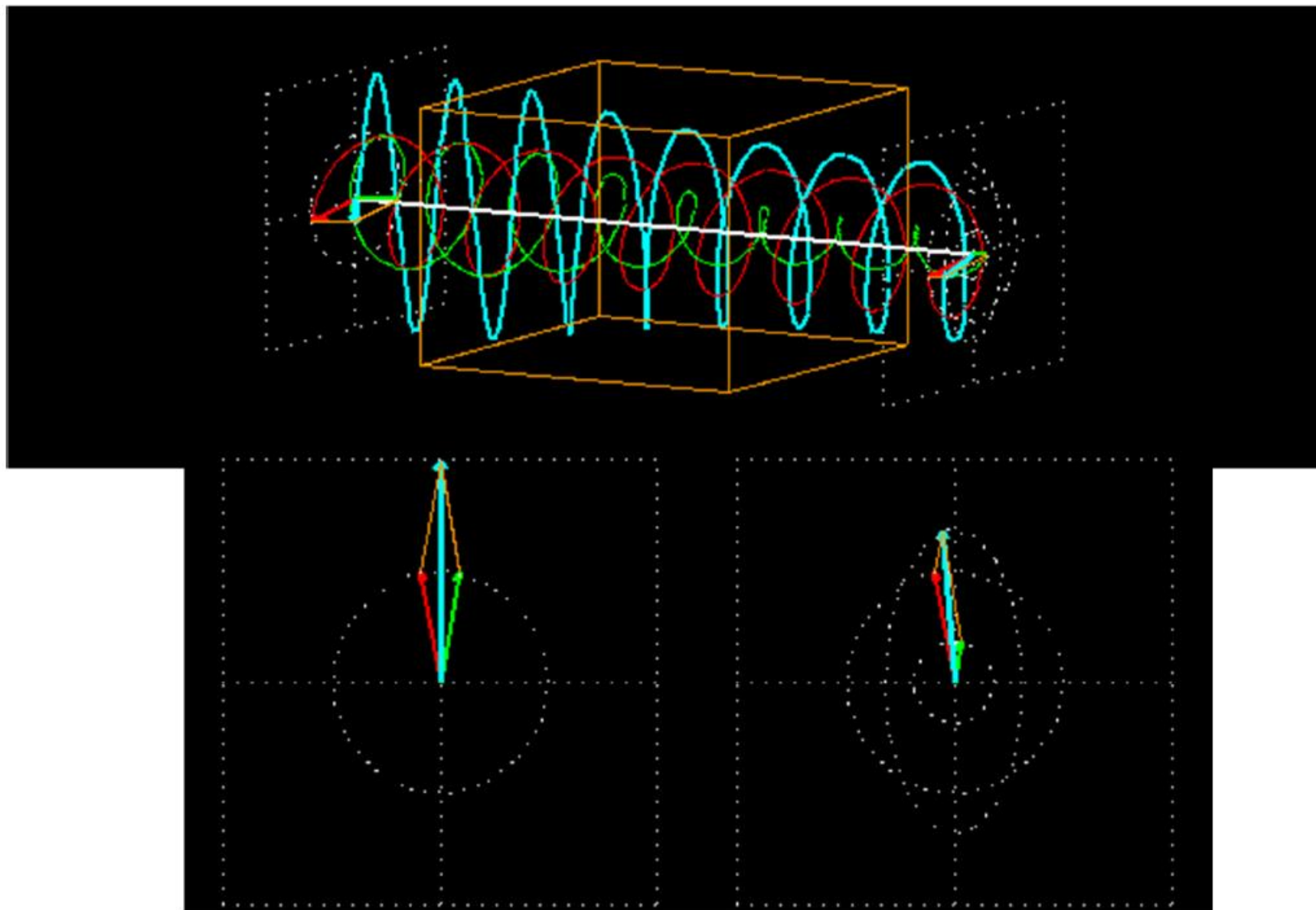


coronene



esaelicene

# Effetto del dicroismo circolare su una polarizzazione lineare



# Lo spettro CD

Un cromoforo chirale, ma anche un cromoforo NON CHIRALE CHE SI TROVI IN UN INTORNO CHIRALE, può assorbire le luci polarizzate circolarmente destra e sinistra in maniera diversa, cioè con assorbanze  $A_D$  ed  $A_S$  (e quindi anche assorbanze specifiche molari  $\varepsilon_D$  ed  $\varepsilon_S$ ) diverse.

Uno spettro CD è un grafico del dicroismo circolare:  $\Delta A = A_S - A_D$

o del dicroismo circolare molare:

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_R - \varepsilon_S$$

in funzione della lunghezza d'onda. Uno spettro CD assomiglia quindi ad un normale spettro UV, ma  $\Delta A$  e  $\Delta \varepsilon$  possono anche assumere valori negativi. Naturalmente la relazione tra  $\Delta A$  e  $\Delta \varepsilon$  è ancora la legge di Lambert-Beer:

$$\Delta A = \Delta \varepsilon \ell C$$

dove  $\ell$  è il cammino ottico (in cm) e  $C$  è la concentrazione molare.

Di solito il dicroismo circolare è espresso sotto forma di **ellitticità molare**.

Se la radiazione incidente sul campione è polarizzata linearmente, all'uscita del campione le due componenti hanno intensità diverse e la radiazione diventa polarizzata ellitticamente.

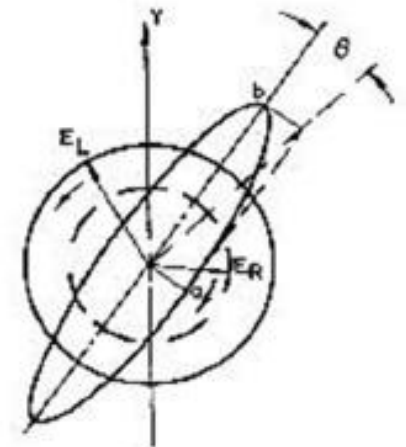
L'**ellitticità**  $\psi$  è definita come un angolo la cui tangente è uguale al rapporto tra l'asse minore ed asse maggiore dell'ellisse, e va da  $0^\circ$  per una luce polarizzata linearmente a  $45^\circ$  per una luce polarizzata circolarmente.

$$\tan \psi = b/a$$

Tuttavia poiché la differenza di assorbanza è sempre molto piccola, anche l'angolo  $\psi$  assume sempre valori piccoli (si possono misurare ellitticità di 1/1000 di grado), ed è quindi approssimativamente proporzionale alla concentrazione. Si può allora definire una **ellitticità molare**  $[\theta]$ :

$$[\theta] = \frac{\psi}{l \cdot c}$$

dove  $l$  è espresso in dm e  $c$  è la concentrazione decimolare, ossia espressa in moli per 100 ml (o dmol/L).

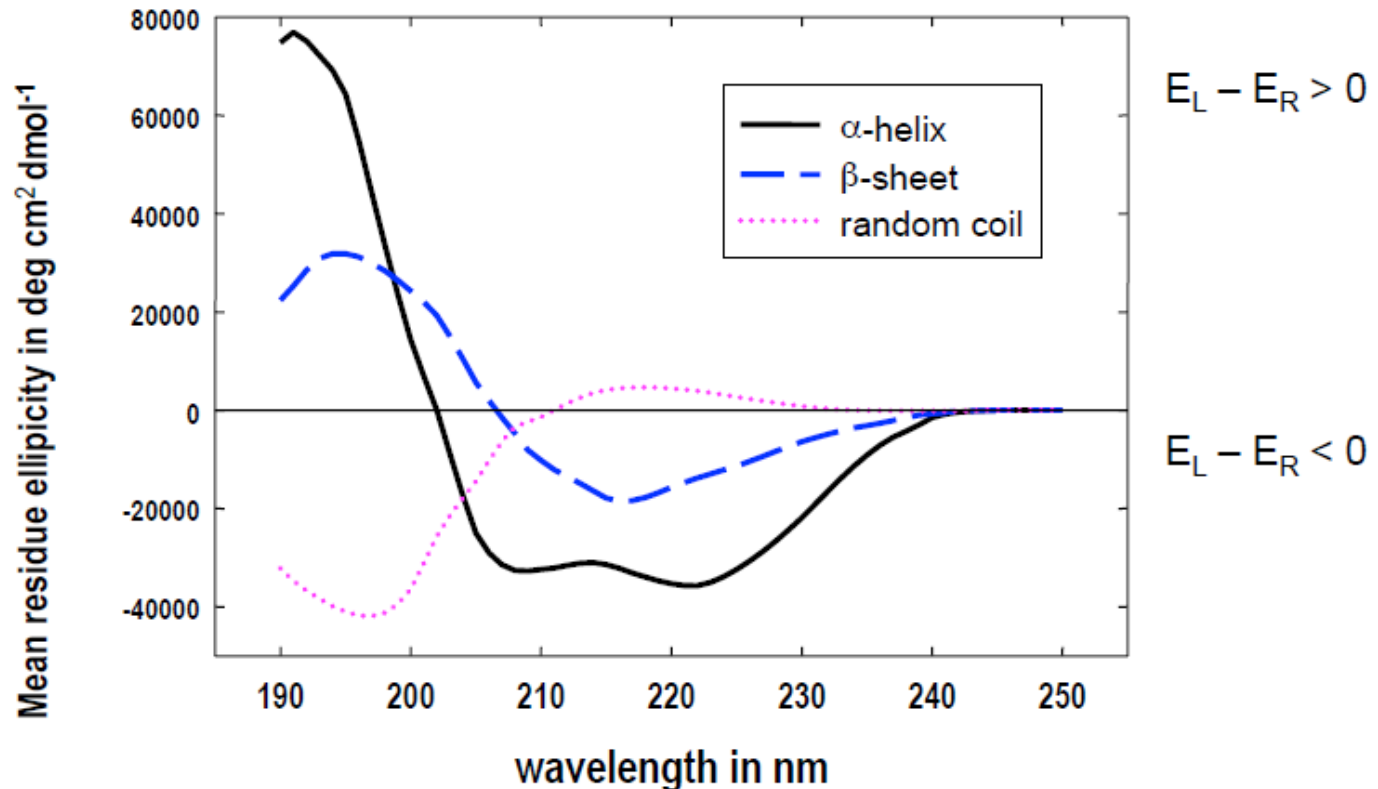


$$\tan \psi = b/a$$

# In particolare:

- Si **osserva CD solamente** a lunghezze d'onda dove l'assorbanza delle componenti D e S della luce polarizzata circolarmente non è nulla, i.e. nelle **bande di assorbimento**.
- Il CD nasce a causa delle interazioni tra i differenti dipoli di transizione che causano l'assorbimento. Poichè questo dipende dalle orientazioni relative dei diversi gruppi nello spazio il segnale è molto **sensibile alla conformazione**.
- In generale quindi  $\Delta\varepsilon$  è molto più dipendente dalla conformazione che  $\varepsilon$ .
- Noi ci concentreremo sul "CD elettronico" di peptidi e proteine sotto 240 nm. Questa regione è dominata dall'assorbimento del legame peptidico ed è sensibile ai cambiamenti della struttura secondaria.
- Possiamo anche fare CD nella regione del vicino UV (osservando le catene laterali trp), visibile (cofattori ecc.) e IR.

# Segnali CD per strutture secondarie pure



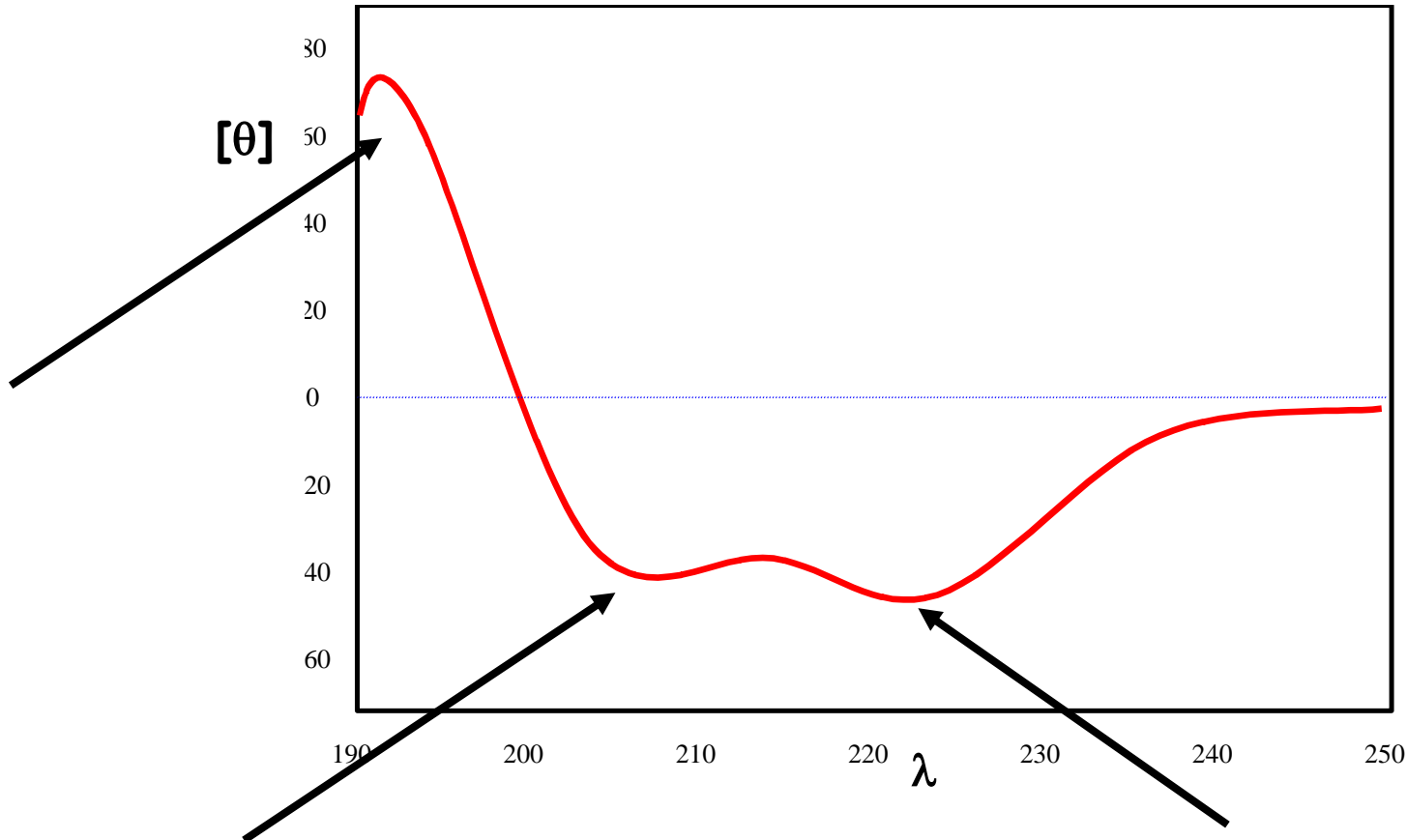
- Queste sono **curve standard di Fasman** per poly-lysine in differenti ambienti. (data from anonymous ftp: jgiqc.llnl.gov)



# $\alpha$ -elica

La conformazione ad  $\alpha$ -elica è la più comune in molte proteine soprattutto quelle globulari.

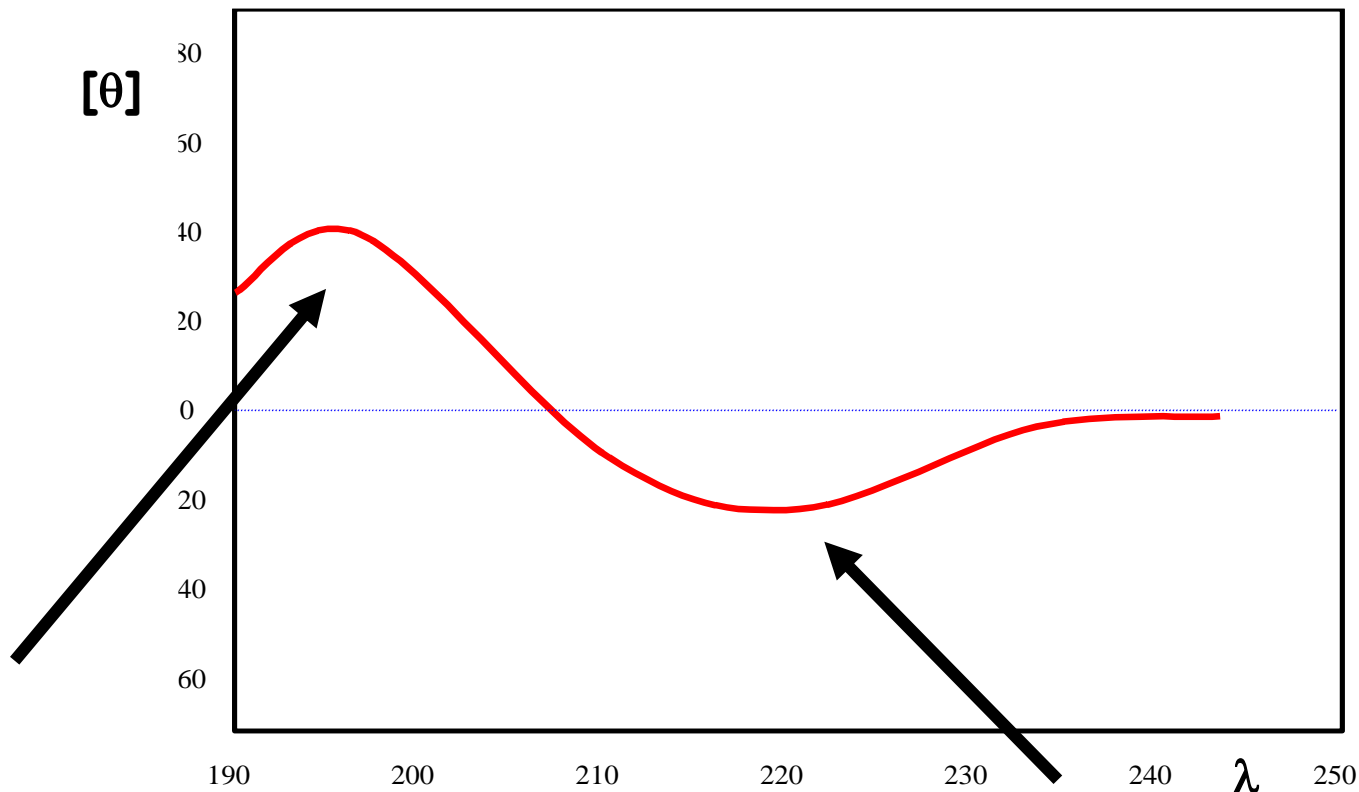
Uno spettro CD di un polipeptide ad  $\alpha$ -elica è tipicamente caratterizzato da una **banda negativa a 222 nm dovuta alla transizione  $n-\pi^*$**  e da **una banda negativa a 208 nm e una positiva a 198 nm** relativa all'exciton coupling delle **transizioni  $\pi-\pi^*$**  del peptide.



# Foglietto $\beta$

Le misure CD di polipeptidi con struttura secondaria di tipo  $\beta$  sono complicate dalla scarsa solubilità del peptide stesso nel solvente solitamente utilizzato per la misura e dalla possibilità che esistano catene parallele o anti parallele.

In genere lo spettro CD mostra due assorbimenti **uno positivo a 195 nm e uno negativo a 216 nm**, di comparabile intensità.

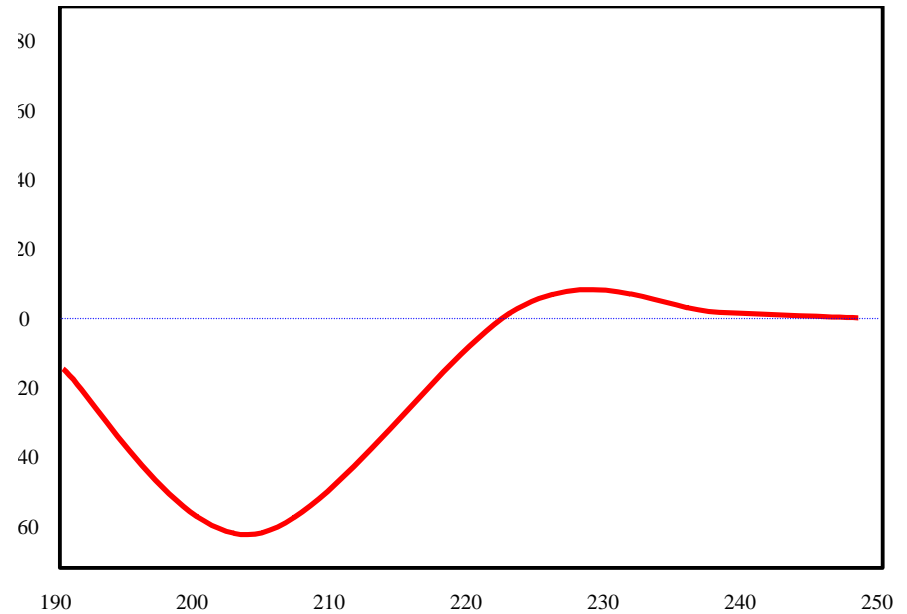
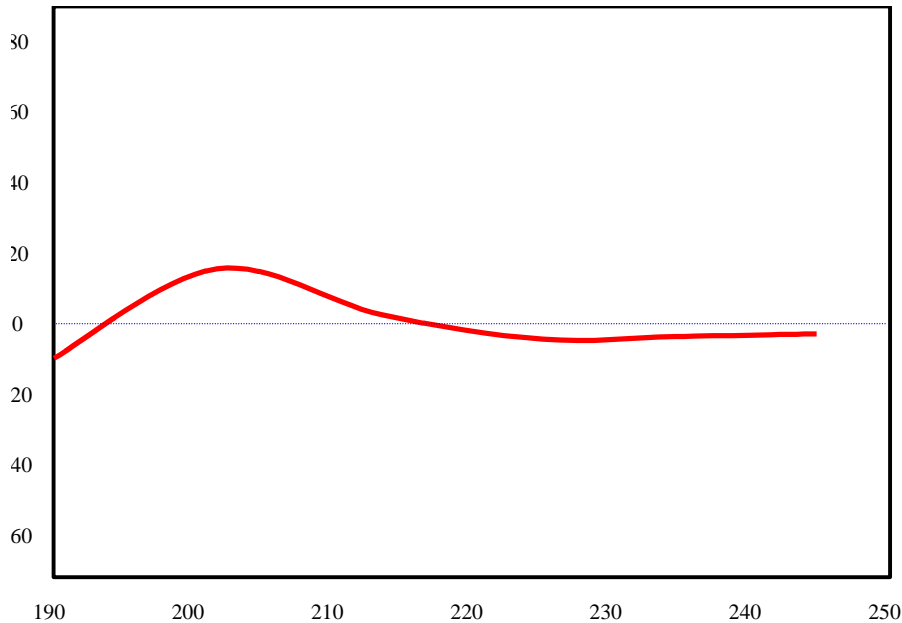


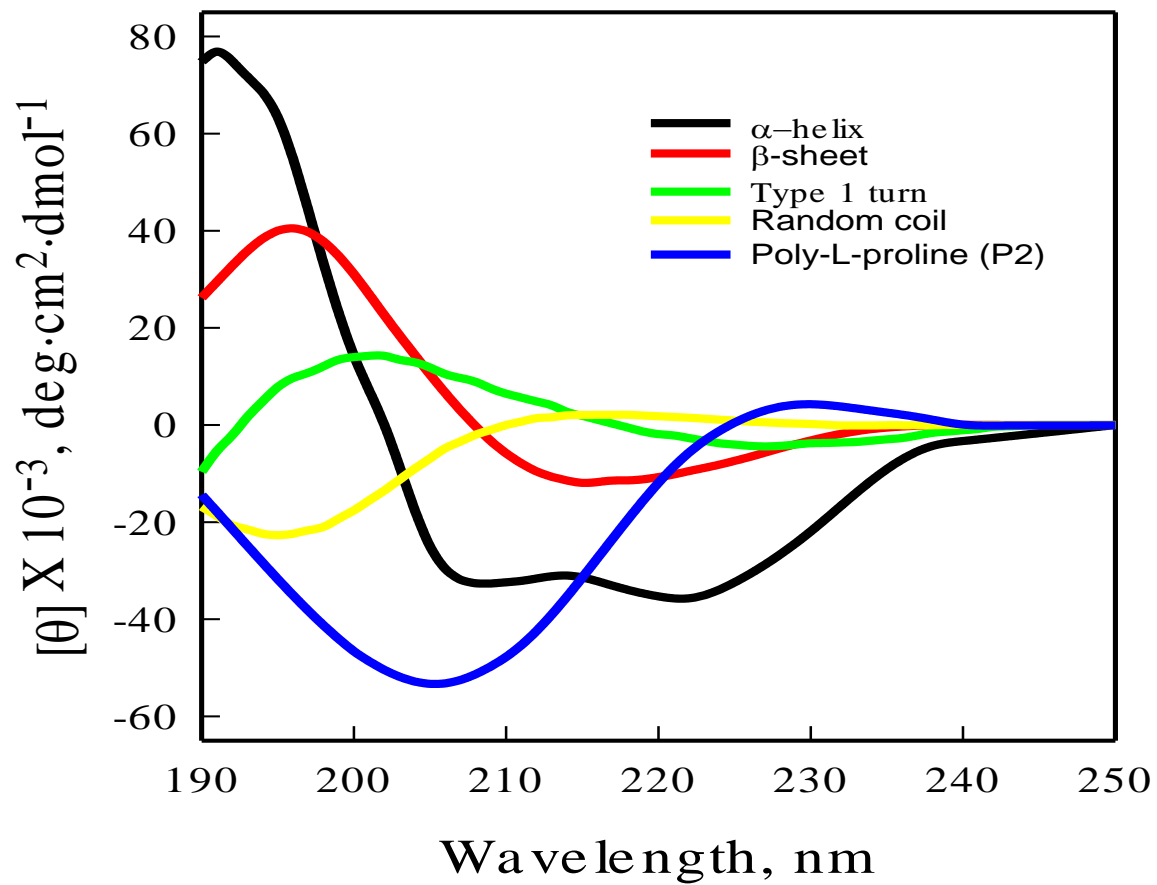
# $\beta$ -turn

**Le strutture secondarie definite  $\beta$ -turn sono quelle in cui la catena peptidica va incontro ad una inversione della sua direzione.**

**Le strutture di questo tipo sono tipicamente presenti in polipeptidi ciclici ricchi di residui di prolina.**

**Gli spettri CD di queste strutture secondarie sono molto meno informativi dei precedenti e possono essere a secondo dei casi simili a quelli dei peptidi a conformazione di foglietto pieghettato o ad  $\alpha$ -elica**





# Applicazioni del CD in biologia strutturale

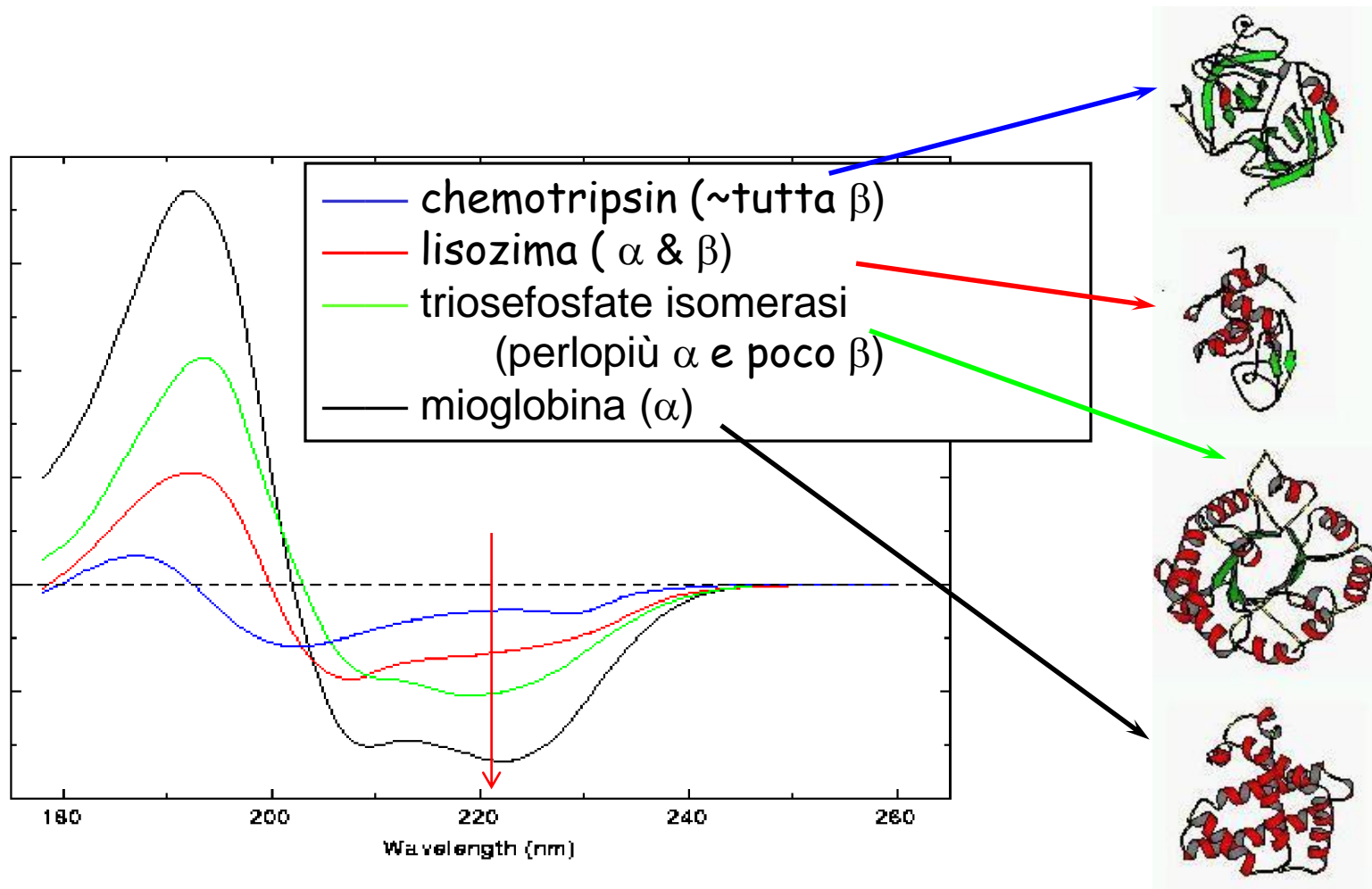
- Determinazione della struttura secondaria di **proteine che non possono essere cristallizzate**
- Studio dell'effetto di farmaci legati sulla struttura secondaria di proteine.
- Processi dinamici, e.g. **folding** delle proteine
- Studi gli **effetti dell' "intorno"** sulla struttura delle proteine
- Struttura secondaria e super secondaria delle **proteine di membrana**
- Studi sui cambiamenti conformazionali indotti dai leganti
- Conformazione dei carboidrati
- Analisi delle **interazioni proteina-proteina** e proteina-acido nucleico

# Perchè utilizzare il CD?

- Facile e veloce
- Preparazione minima del campione
- Misure in soluzione
- Concentrazioni/quantità di campioni basse
- Tempi di risoluzione di microsecondi
- Qualsiasi dimensione macromolecolare

## I contributi sono additivi

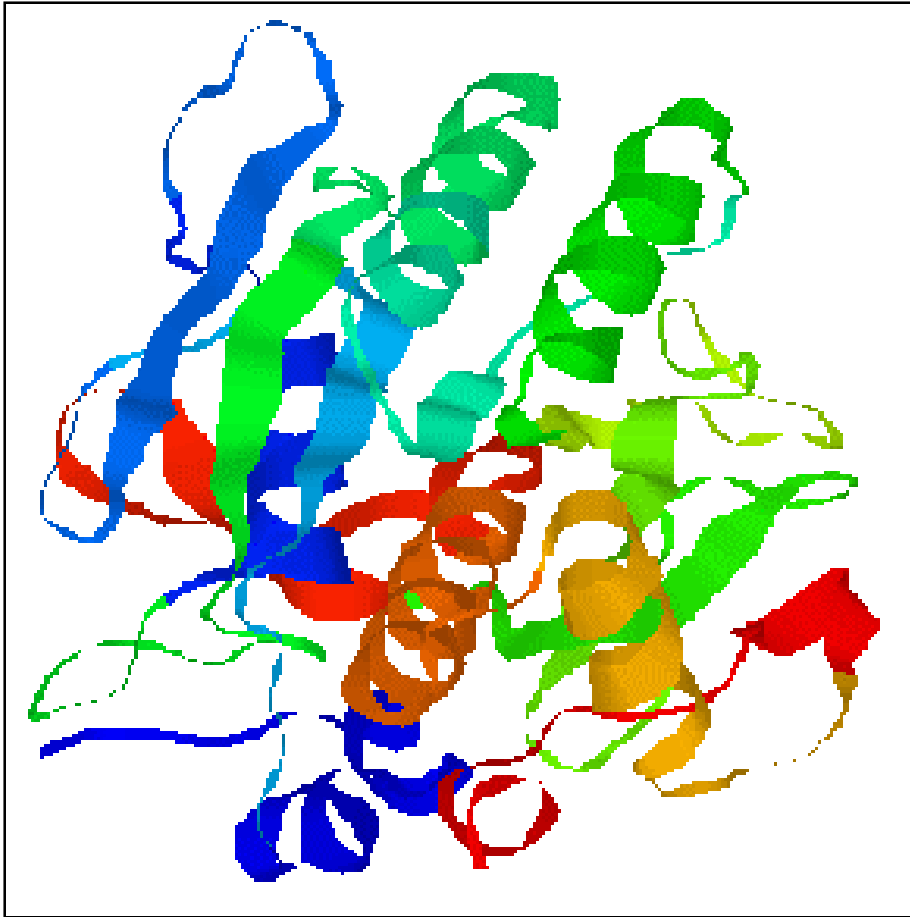
–Si può determinare il contributo della struttura  $\alpha$  elica, della  $\beta$  a pieghe e del “random coil” mediante misure CD del peptide in soluzione



- N.B. il progressivo cambiamento a  $\theta_{222}$  con l'incrementare della struttura a elica



La struttura della **subtilisina** ottenuta da dati CD e calcoli al computer è in accordo con la struttura trovata da dati di diffrazione di raggi X



58% helix

26% sheet

16% coil

La subtilisina è un enzima proteolitico

# Dicroismo circolare e conformazioni

PROTEIN SECONDARY STRUCTURES DETERMINED BY INFRARED SPECTRAL DECONVOLUTION AND CIRCULAR DICHROISM SPECTRA AND X-RAY CRYSTALLOGRAPHY<sup>a</sup>

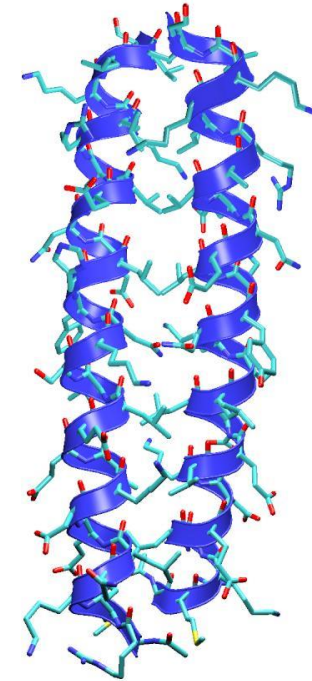
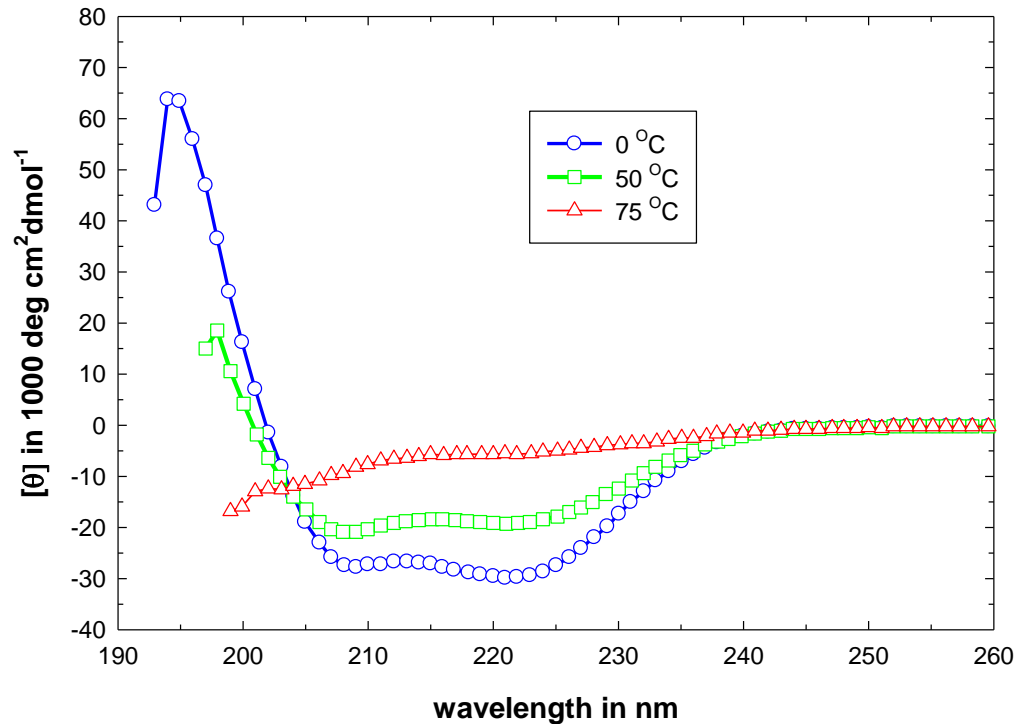
Protein	Secondary structure (%)				Method
	$\alpha$ Helix	$\beta$ Sheet	Turn	Random	
Hemoglobin	78 <sup>b</sup>	12	10	<sup>b</sup>	IR-SD
	87	0	7	6	X-Ray
	68-75	1-4	15-20	9-16	CD
Myoglobin	85 <sup>b</sup>	7	8	<sup>b</sup>	IR-SD
	85	0	8	7	X-Ray
	67-86	0-13	0-6	11-30	CD
Lysozyme	40	19	27	14	IR-SD
	45	19	23	13	X-Ray
	29-45	11-39	8-26	8-60	CD
Cytochrome c (oxidized)	42	21	25	12	IR-SD
	48	10	17	25	X-Ray
	27-46	0-9	15-28	28-41	CD
$\alpha$ -Chymotrypsin	9	47	30	14	IR-SD
	8	50	27	15	X-Ray
	8-15	10-53	2-22	38-70	CD
Trypsin	9	44	38	9	IR-SD
	9	56	24	11	X-Ray
Ribonuclease A	15	40	36	9	IR-SD
	23	46	21	10	X-Ray
	12-30	21-44	11-22	19-50	CD
Alcohol dehydrogenase	18	45	23	14	IR-SD
	29	40	19	12	X-Ray
Concanavalin A	8	58	26	8	IR-SD
	3	60	22	15	X-Ray
	3-25	41-49	15-27	9-36	CD
Immunoglobulin G	3	64	28	5	IR-SD
	3	67	18	12	X-Ray
Major histocompatibility complex antigen A2	17	41	28	14	IR-SD
	20	42			X-Ray
	8-13	74-77			CD
$\beta_2$ -Microglobulin	6	52	33	9	IR-SD
	0	48			X-Ray
	0	59			CD

# Gli spettri CD dipendono dalle condizioni

La temperatura è il parametro più critico

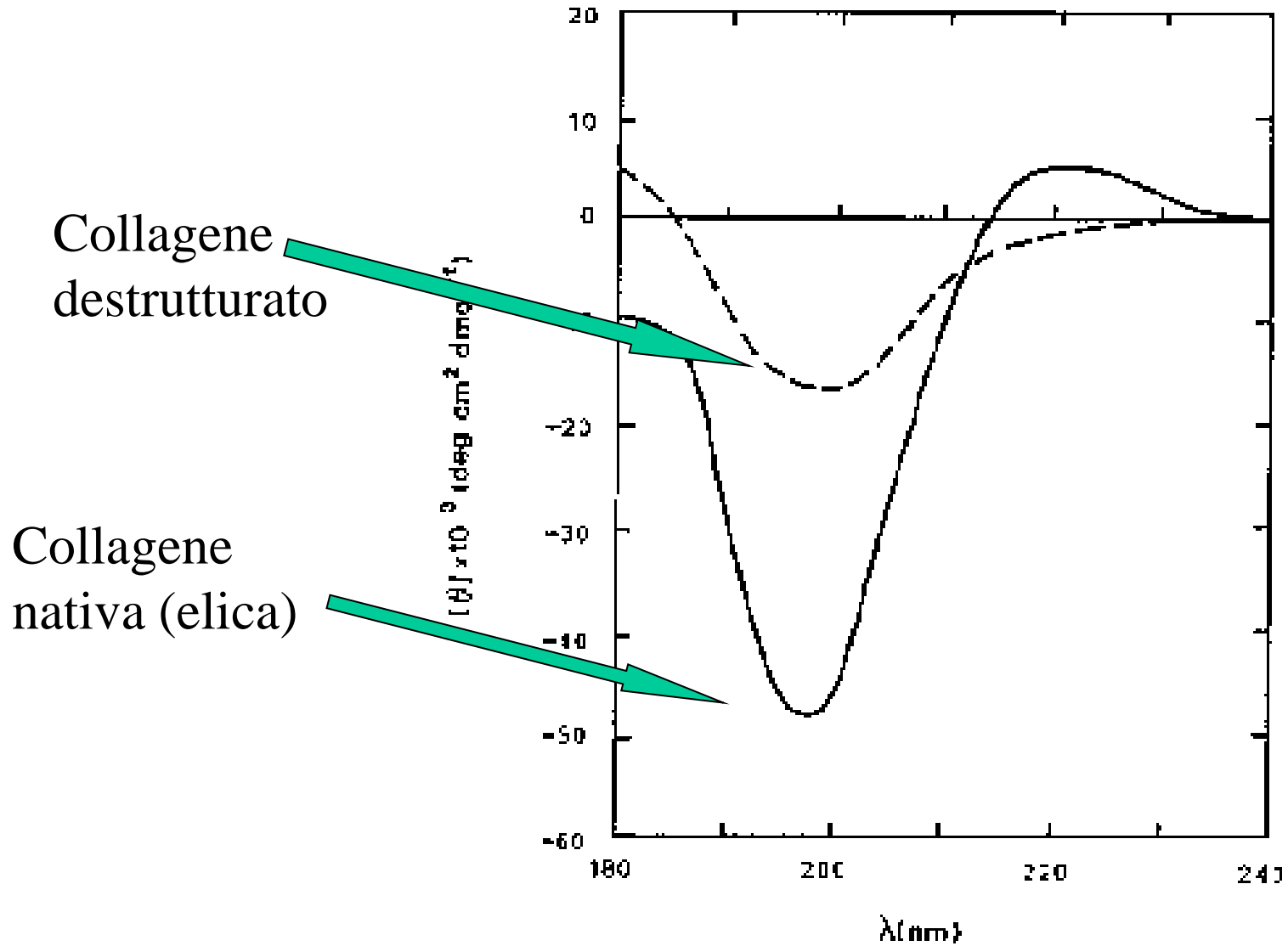
## CD signals for GCN4-p1

O'Shea *et al.* Science (1989) **243**:538  
figure 3: 34 $\mu$ M GCN4-p1 in 0.15M NaCl,  
10mM phosphate pH 7.0



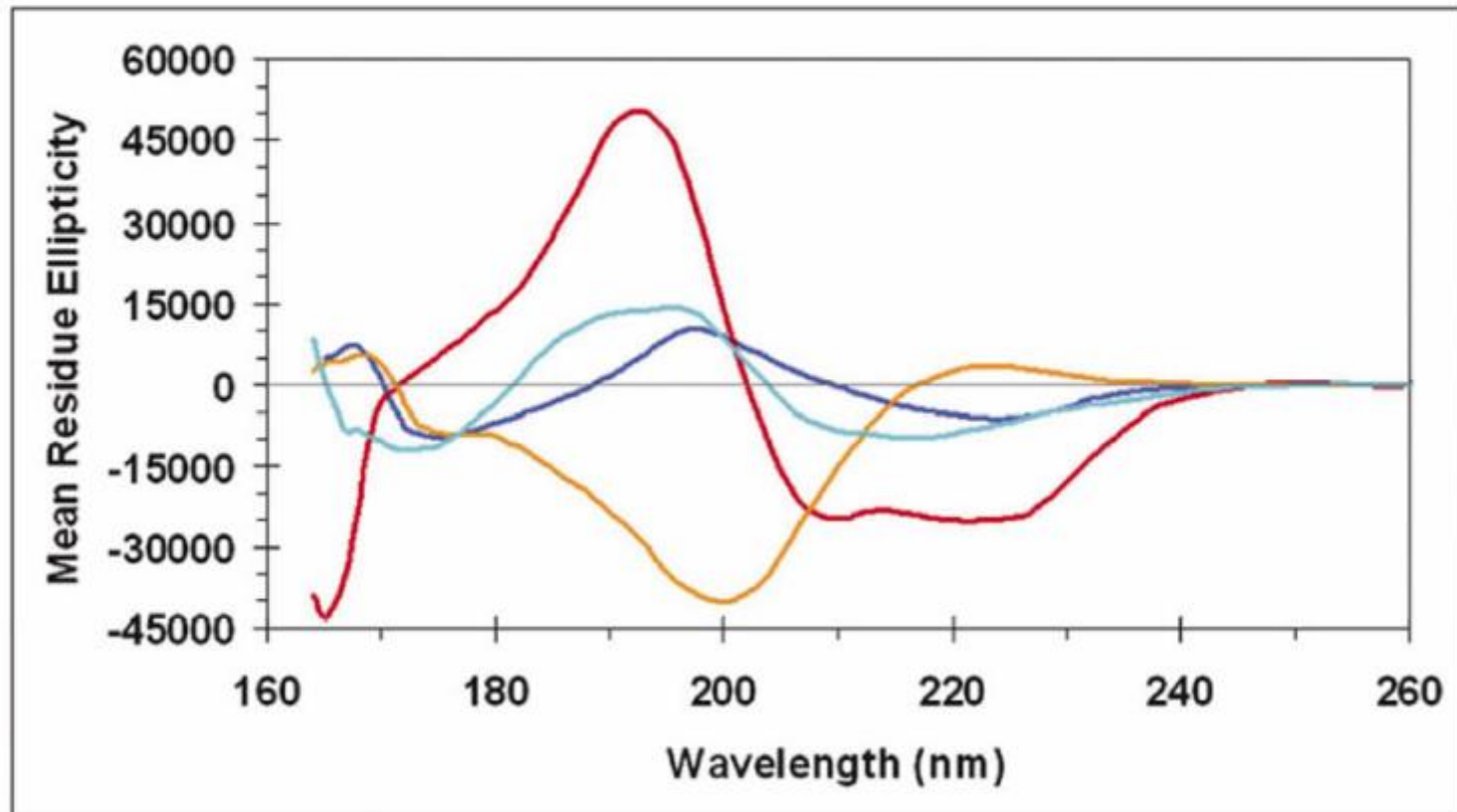
- 100% di elica a 0°C
- Diventa random coil aumentando la T

# Lo spettro del collagene



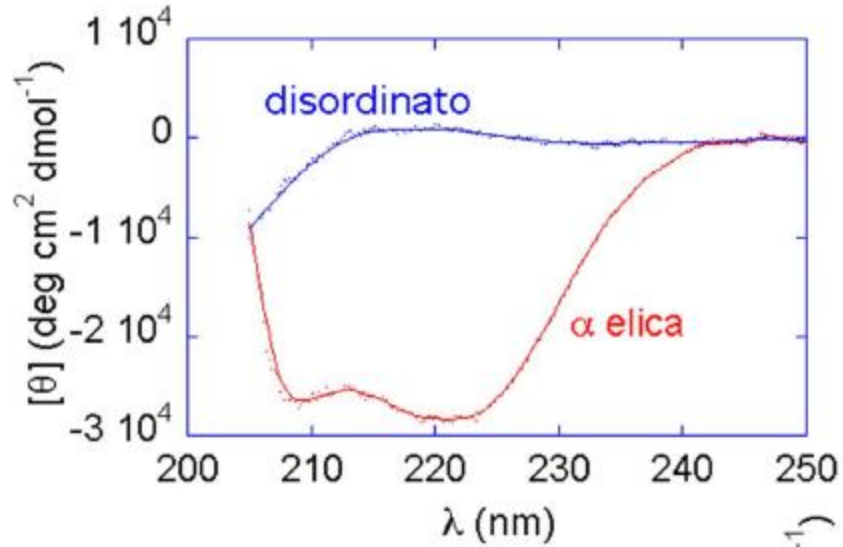
# CD di proteine: lontano UV

- Effettuando la deconvoluzione dello spettro di una proteina come somma degli spettri delle diverse strutture secondarie è possibile determinarne la frazione.

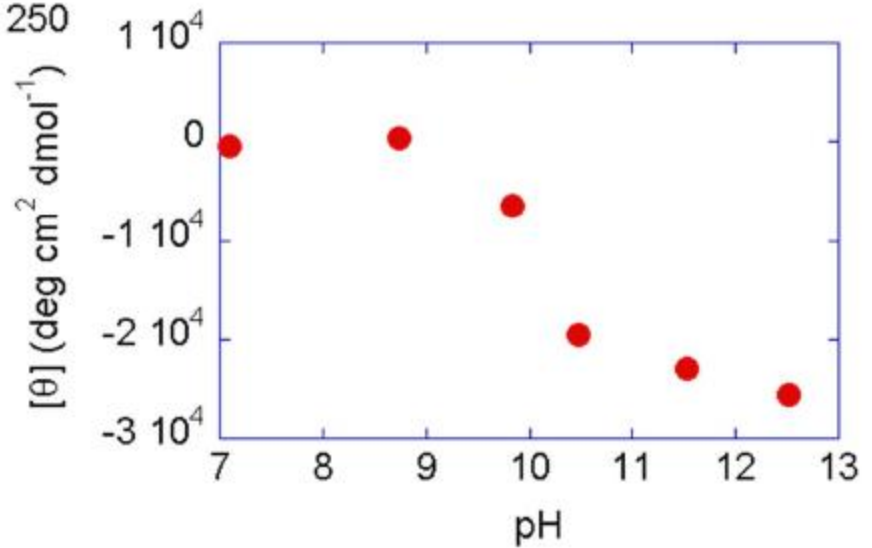
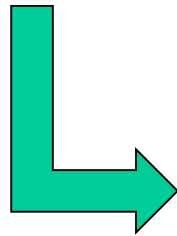


A mostly helical protein, myoglobin (in red), two mostly beta-sheet proteins, concanavalin A (blue) and beta-lactoglobulin (cyan), and a polyproline-rich protein, collagen (orange).

# CD di proteine: lontano UV



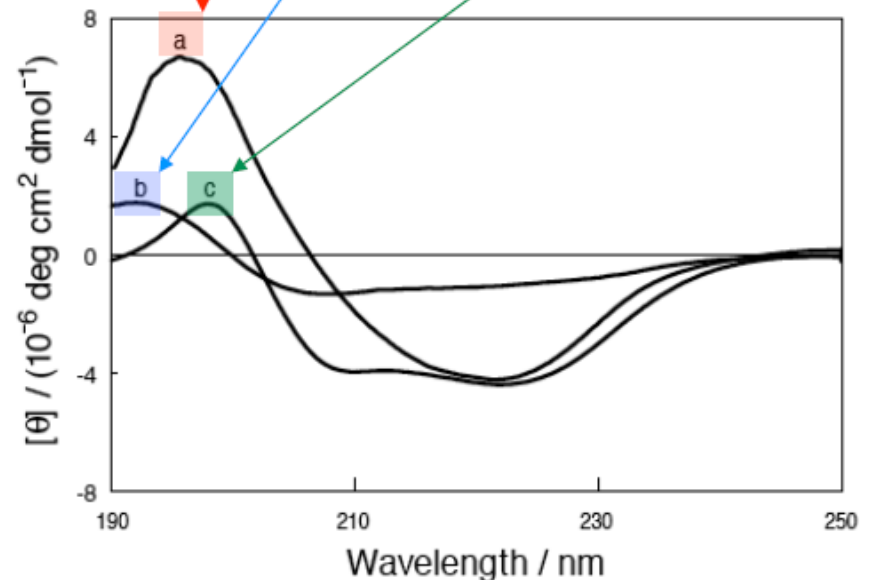
$[\theta]_{220}$



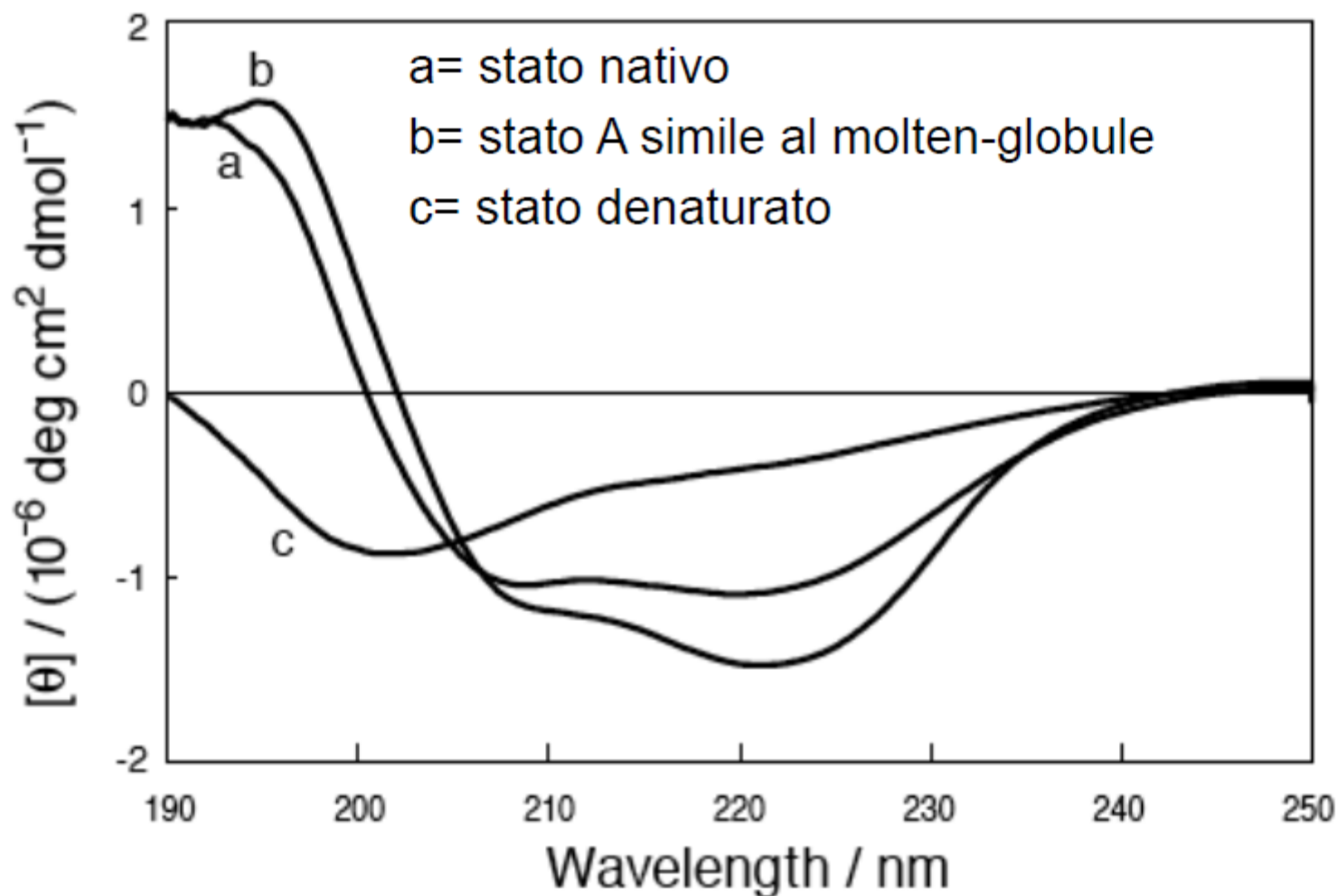
# Esempi: Proteine Globulari

Protein	Ref	Structural Type	Characteristic spectral features
Concanavalin A	—	$\beta$ -sheet	Single minimum at 224 nm
Poly-L-lysine	15	$\beta$ -sheet	Single minimum at 218 nm
Lysozyme	—	$\alpha + \beta$	$\alpha$ -Helical spectral features dominate, but the intensities of the double minimum are roughly reversed relative to an $\alpha$ -helix
Myoglobin	—	$\alpha$ -helical	Double minimum at about 209, 222 nm
Poly-L-lysine	15	$\alpha$ -helical	Double minimum at about 209, 221 nm

**N.B.: Poli-L-Lisina**  
 riferimento per strutture  
 tutta  $\alpha$ -elica o tutta  $\beta$ -  
 foglietto

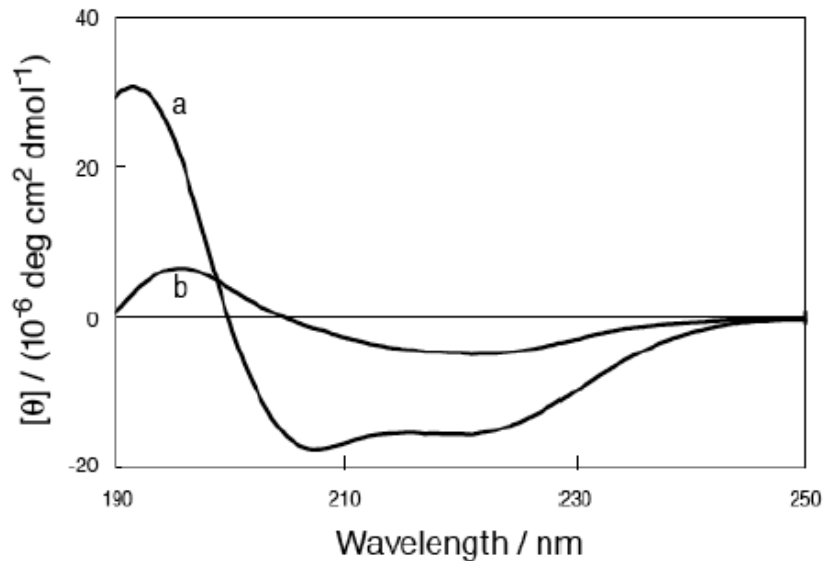


# Denaturazione Chimica Cyt-C





# Concanavalin A: effetto TFE

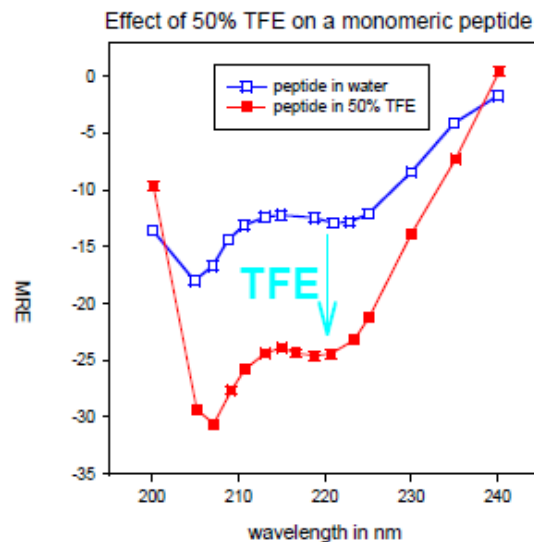


**a = in presenza di TFE**  
**b = Nativa**

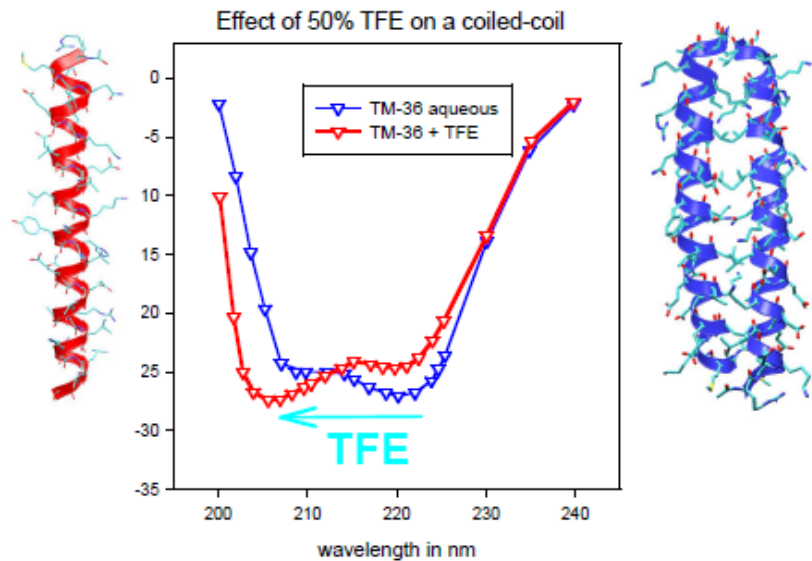
protein structures and folding patterns. As is seen in Figure 5, when TFE is added to the solution, the CD spectrum for native-state concanavalin A changes from one having a single minimum to one having minima at both 208 and 221 nm. The minima at these wavelengths clearly indicate conversion of some of the  $\beta$ -sheet structure into  $\alpha$ -helix. However, the fact that the minimum at 221 nm is more shallow than the one at 208 nm reveals that not all of the  $\beta$ -sheet structure undergoes conversion. In fact, the presence of TFE in solution makes the spectrum more closely resemble that for the  $\alpha + \beta$  protein lysozyme.

# Effetto del Solvente

- Effetto di trifluoroethanol (TFE) su un coiled-coil simile a GCN4-p1
- TFE induce ellitticità in tutti i peptidi



- Ma su un coiled-coil rompe le eliche dimere portando a eliche singole



Lau, Taneja and Hodges (1984)  
J.Biol.Chem. **259**:13253-13261

# CD di acidi nucleici

- In questo caso i cromofori sono le basi (la catena principale assorbe solo sotto 150 nm).
- Assorbimento e CD dipendono dalla **sequenza** oltre che dalla **conformazione**!

UV

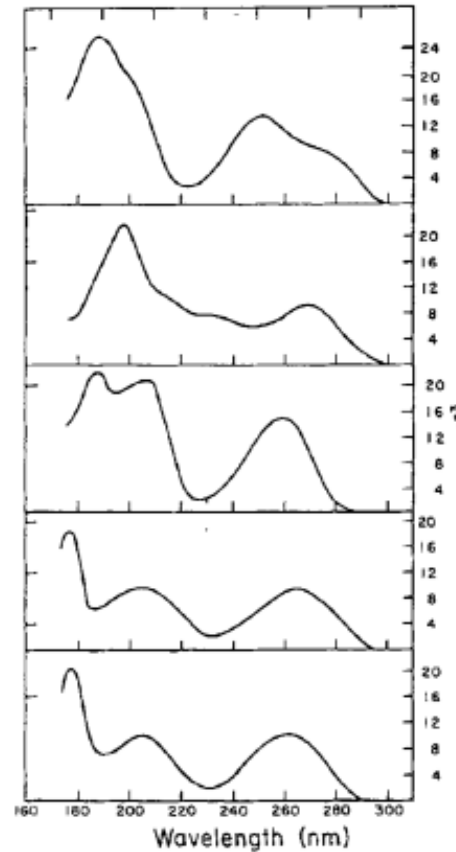


Figure 2. Electronic absorption spectra for the deoxyribonucleoside phosphates of (from top to bottom) adenine, guanine, cytosine, thymine, and uracil in neutral aqueous buffer. (Reprinted with permission from *Biopolymers* 16:2243-2264, 1977. © 1977, John Wiley and Sons, Inc.)

CD

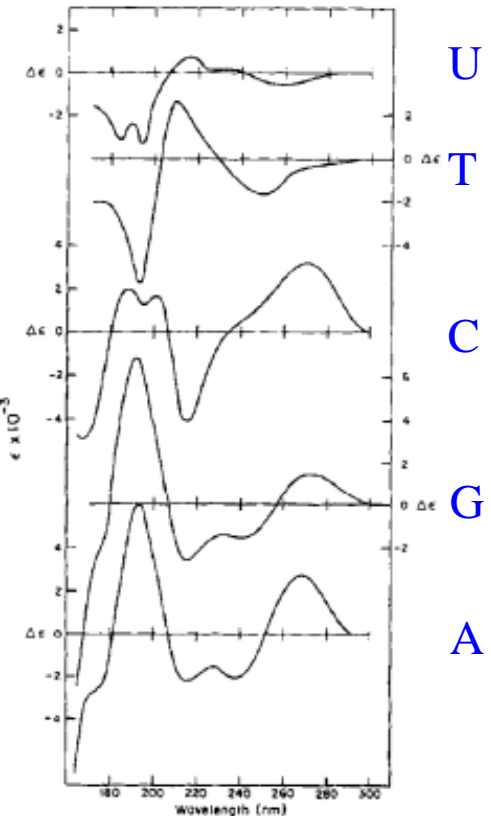
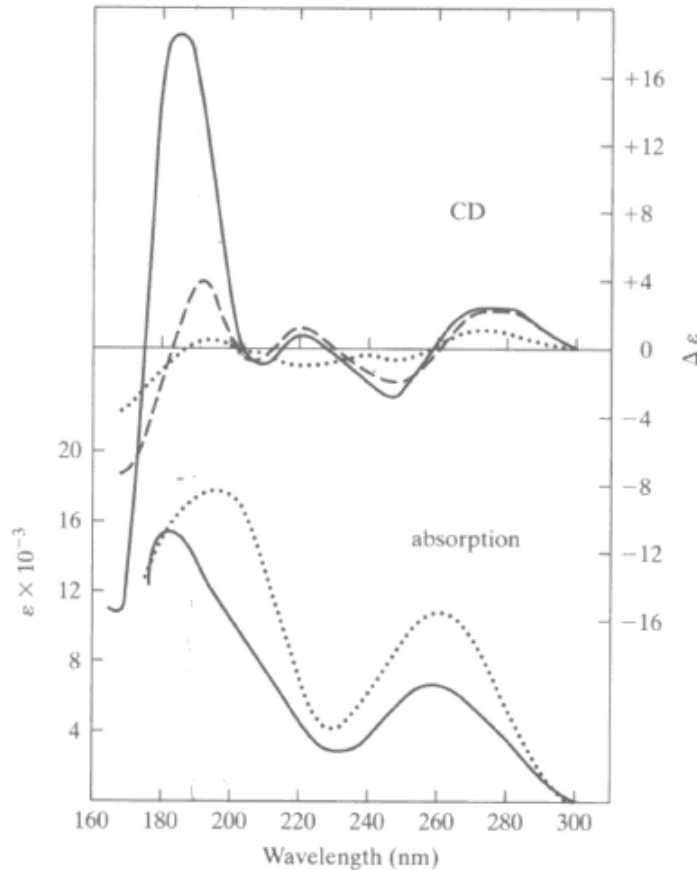


Figure 3. CD spectra for the five deoxyribonucleoside phosphates of (from top to bottom) adenine, guanine, cytosine, thymine, and uracil in neutral aqueous buffer. (Reprinted with permission from *Biopolymers* 16:2243-2264, 1977. © 1977, John Wiley and Sons, Inc.)

U  
T  
C  
G  
A

# Esempio: DNA



- CD of *E. Coli* DNA

— Nativo

- - - - Denaturato

- Per esempio a 260 nm

$$\Delta \epsilon = \sim 3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon = \sim 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



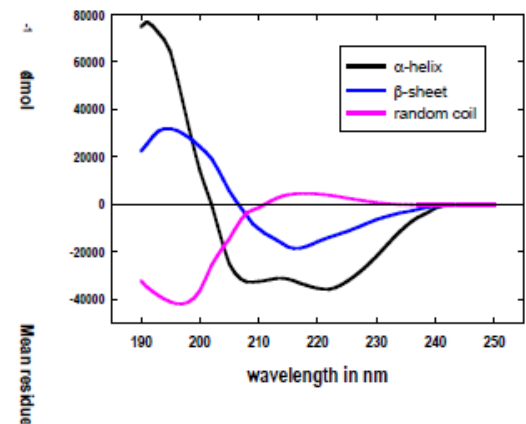
## Combinazione Lineare di segnali CD puri

- Fittare la curva incognita con una combinazione di curve standard.
- Nel caso più semplice usare gli standard di Fasman

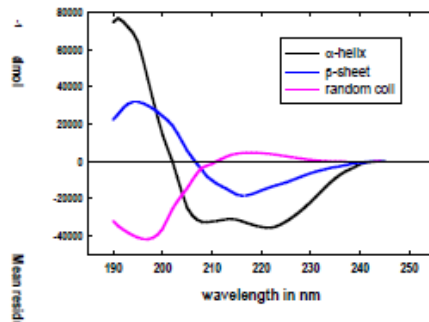
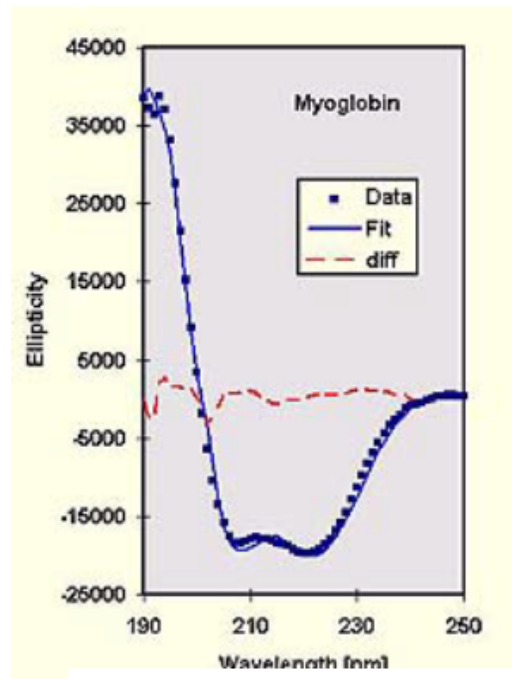
$$\theta_{\text{totale}} = x_{\alpha}\theta_{\alpha} + x_{\beta}\theta_{\beta} + x_{\text{c}}\theta_{\text{c}} + (x_{\text{t}}\theta_{\text{t}})$$

- Variare  $x_{\alpha}$ ,  $x_{\beta}$ ,  $x_{\text{t}}$  e  $x_{\text{c}}$   
per miglior fitting di  $\theta_{\text{totale}}$  a  $\theta_{\text{exp}}$   
mentre  $x_{\alpha} + x_{\beta} + x_{\text{t}} + x_{\text{c}} = 1.0$

minimizzazione ai minimi quadrati

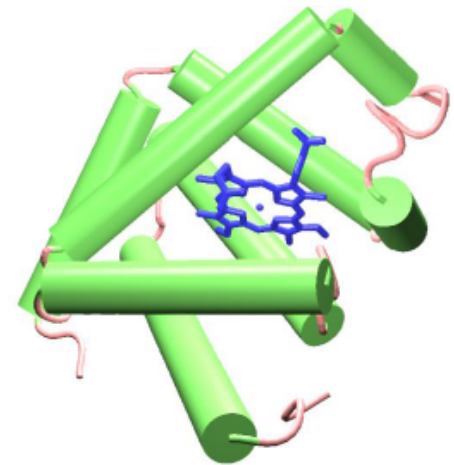


# Esempio di fitting: Mioglobina



- In questo caso:

$$\theta_{\text{totale}} = x_{\alpha}\theta_{\alpha} + x_{\beta}\theta_{\beta} + x_{\text{c}}\theta_{\text{c}}$$



- la struttura e':  
78% helix, 22% coil  
Per ulteriori dettagli:

[www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm](http://www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm)

# Set di base: molte proteine

- Ci sono diversi algoritmi.
  - Tutti contano sull'uso di fino a 20 spettri CD di proteine di struttura nota.
  - Miscelando questi è possibile ottenere uno spettro che fitta un incognito
  - Per tutti i dettagli vedi:
    - Dichroweb: il sistema di analisi CD online  
[www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/)
  - è possibile ottenere un'accuratezza: (coeff. di regressione R)
    - 0.97 per eliche,
    - 0.75 per foglietti beta,
    - 0.50 per turns, e
    - 0.89 per altri tipi di strutture
- (Manavalan & Johnson, 1987, Anal. Biochem. **167**, 76-85).



# Aspetti pratici

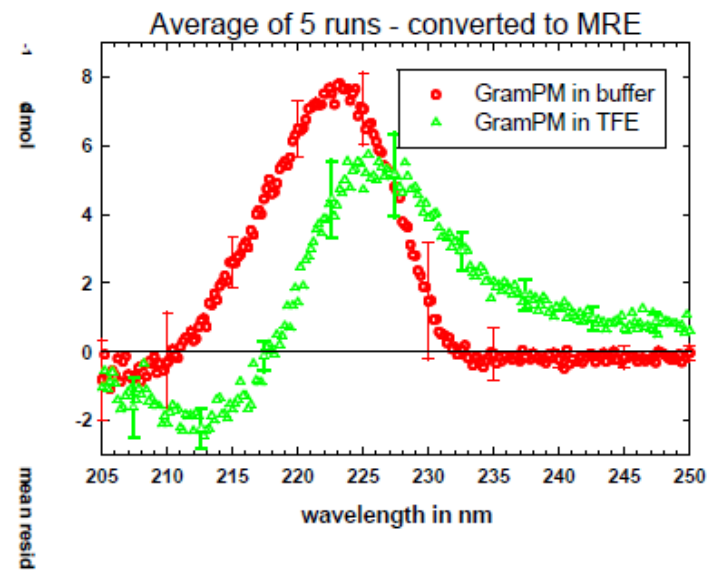
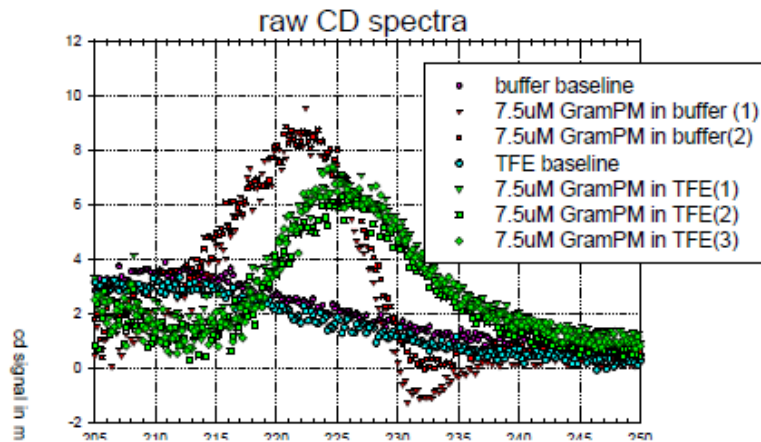


- Il CD si basa sul misurare una differenza veramente piccola tra due segnali grandi: deve essere fatta attentamente
- L' Abs deve essere ragionevole, max tra  $\sim 0.5$  and  $\sim 1.5$ .
- **Celle di quarzo** di lunghezza tra 0.0001 cm e 10 cm. 1cm e 0.1 cm sono comuni
- Deve essere fatta attenzione con tamponi, TRIS: cattivi - UV abs alta
- Misurare la linea di base della cella con il solvente
- Così un campione con la stessa cella è introdotto circa allo stesso modo
- La torbidità uccide la misura- filtrare le soluzioni
- Ogni cosa deve essere pulita
- **Per accurata misura della struttura secondaria deve essere nota la concentrazione**

# Tipiche condizioni per il CD

- Concentrazione delle proteine: 0.25 mg/ml
- Lunghezza della cella: 1 mm
- Volume 400  $\mu$ l
- Necessità di poco campione 0.1 mg
- Concentrazioni ragionevoli
- Stabilizzatori (ioni metellici, etc.): minima quantità
- Concentrazione di campione: 5 mM più bassa possibile per mantenere la stabilità delle proteine
- Un metodo di biologia strutturale che può dare risposte reali in un giorno.

# Un esperimento CD reale



- CD di una sospensione di gramicidina in acqua
- Raw spectra - dati ogni 0.2nm da 205nm a 250nm, ciascun punto misurato 5 volte al 1sec in media.
- Notare che la linea di base varia da cella a cella e se lo strumento viene mosso, cambiata la lampada, ricalibrato ...
- Notare il rumore – è il motivo per cui misuriamo gli stessi punti molte volte
- Spettro finale la media di 5 cicli (con circa 3 linee di base).

# Ulteriori Informazioni in rete

- Lawrence Livermore National Laboratory CD tutorial  
[www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm](http://www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm)
- Birkbeck College CD Tutorial  
[www.cryst.bbk.ac.uk/BBS/whatis/cd\\_website.html](http://www.cryst.bbk.ac.uk/BBS/whatis/cd_website.html)
- Karolinska Institutet PPS material on CD  
[broccoli.mfn.ki.se/pps\\_course\\_96/ss\\_960723\\_21.html](http://broccoli.mfn.ki.se/pps_course_96/ss_960723_21.html)
- CD links page at Daresbury  
[www.srs.dl.ac.uk/VUV/CD/links.html](http://www.srs.dl.ac.uk/VUV/CD/links.html)
- Dichroweb: online CD analysis tool  
[www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/)